

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FETT, Günter
Acordis AG
Kasinostrasse 19-21
D-42103 Wuppertal
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 February 2001 (16.02.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference AGW 2503 WO	
International application No. PCT/EP00/02011	International filing date (day/month/year) 08 March 2000 (08.03.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address AKZO NOBEL NV Postbus 9300 NL-6824 BM Arnhem Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input checked="" type="checkbox"/> the nationality <input checked="" type="checkbox"/> the residence		
Name and Address ACORDIS INDUSTRIAL FIBERS GMBH Kasinostrasse 19-21 D-42103 Wuppertal Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 20 October 2000 (20.10.00)	
International application No. PCT/EP00/02011	Applicant's or agent's file reference AGW 2503 WO
International filing date (day/month/year) 08 March 2000 (08.03.00)	Priority date (day/month/year) 09 March 1999 (09.03.99)
Applicant GLÖCKNER, Herma et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
29 September 2000 (29.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Manu Berrod
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPK 7 C12Q1/02 C12M3/06 B01J19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched (classification system followed by classification symbols) IPK 7 C12Q C12M B01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^o	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
P, X	DE 198 10 901 C (Ascalon Gesellschaft Fuer Innovation) June 17 1999 (06-17-1999) Abstract Column 3, Line 15 – Line 48 Figures 1-3	1-15
P, X	WO 99 28438 A (Assistance Publique-Hopitaux De Paris; Luc Douay (FR); Bertin & Cie (FR) June 10, 1999 (06-10-1999) Abstract Figure 2 Page 4, Line 32 – Line 35 Page 13, Line 23 – Line 27	1-15
X	US 4,937,196 A (Wolfgang J. Wrasidlo et al.) June 26, 1990 (06-26-1990) Abstract Column 8, Line 45 – Column 9, Line 41	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
^o Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the Actual Completion of the International Search July 7, 2000		Date of Mailing of the International Search Report July 14, 2000
Name and mailing address of ISA/ Europaisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer B. Routledge Telephone No. (+31-70)340-2040

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information Relative to Members of Patent FamiliesInternational Application No.
PCT/EP 00/01819

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Member(s) of Patent Family	Publication Date
DE 19810901 C	06-17-1999	NONE	
WO 9928438 A	06-10-1999	FR 2771421 A	05-28-1999
US 4,937,196 A	06-26-1990	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

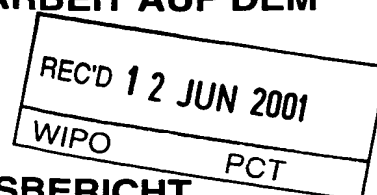
T_h

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts AGW 2503 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02011	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/02		
Anmelder ACORDIS INDUSTRIAL FIBERS GMBH et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 29/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 08.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Thumb, W Tel. Nr. +49 89 2399 7350 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlag d s B richts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-45 mit Telefax vom 31/05/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02011

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-45
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	3
	Nein: Ansprüche	1, 2, 4-45
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-45
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt



THIS PAGE BLANK (USPTO,

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt II

Priorität

Die im Recherchenbericht zitierten Dokumente DE-C-198 10 901 und WO-A-99/28438 sind nicht als Stand der Technik nach Artikel 6 PCT zu berücksichtigen, da der beanspruchte Prioritätstag den relevanten Teilen der vorliegenden Anmeldung zuerkannt werden kann.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die mit dem Schreiben vom 8.2.2001 eingereichten Ansprüche 1-45 bringen keine Sachverhalte ein, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen und erfüllen daher die Erfordernisse von Artikel 34(2)(b) PCT.

2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-4 937 196

D3: EP-A-0 180 165

D4: US-A-4 661 458

3. Neuheit

Ansprüche 1-45 sind neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT, da eine Verfahren zum in vitro Testen von Wirkstoffen an Zellen, welches das Zudosieren von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum gemäß einem vorgeschriebenen Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlaufes erfolgt beinhaltet, sowie eine Vorrichtung zum Durchführen besagter Methode mit den in Anspruch 25 definierten Merkmalen im Stand der Technik nicht beschrieben sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. Erfinderische Tätigkeit

Dokument D1 beschreibt einen Bioreaktor, der eine Zone beinhaltet, die aus Schichten aus porösen Membranen aufgebaut ist, und welche die zu kultivierenden Zellen enthält. Eine hydrophile Membran ist für den Zu- und Abtransport von Nährstoffen geeignet, eine zweite ist permeabel für Gase, zum Beispiel Sauerstoff oder Kohlendioxid (Spalte 8, Zeilen 45-64). In einer speziellen Ausführung enthält der Bioreaktor Hohlfasern aus Teflon, welche die Sauerstoffdiffusion verbessern. Der Zellkulturraum kann so konstruiert sein, daß sich jede Zelle in eine Distanz von 100 - 200 μ M zu der Sauerstoff-transportierenden Membran befindet (Spalte 9, Zeilen 13-41). Die Membranen können in Schichten angeordnet werden (z.B. Abbildung 6).

Die Zellen werden in einer Dichte von 10^9 Zellen/ml eingesetzt.

Die Zufuhr von Nährstoffen wird durch ein Pumpsystem kontrolliert (Spalte 10, Zeilen 19-21). Die Temperatur des Nährmediums wird durch einen Thermostaten eingestellt (Spalte 12, Zeilen 3-11). Die Zufuhr von Nährstoffen, welche unter anderem auch Wachstumsfaktoren und Hormone enthalten können (Spalte 15, Zeilen 19-21) kann kontinuierlich oder schrittweise erfolgen, und die optimalen Bedingungen können individuell eingestellt werden (Spalte 15, Zeile 57 - Spalte 16, Zeile 1).

Der Bioreaktor kann für die Kultivierung von Hybridomzellen und anderer Zellen eingesetzt werden (Spalte 4, Zeilen 11-16). Mehrere solcher Reaktoren können parallel laufen (Spalte 13, Zeilen 55-58).

4.2 Der Gegenstand von Anspruch 1 unterscheidet sich von dem in D1 offenbarten dadurch, daß die Auswirkungen eines Wirkstoffes auf die in dem Zellkulturbehälter vorliegenden Zellen beobachtet wird.

Das Anspruch 1 zugrunde liegende Problem kann daher darin gesehen werden, eine Methode zur Evaluierung des Einflusses weiterer Faktor auf das Zellwachstum als die in D1 beschriebenen zur Verfügung zu stellen.

Die Untersuchung der Auswirkung von Substanzen auf das Wachstum von Zellen ist jedoch eine Standardmethode im Stand der Technik und dem Fachmann bekannt, wie auch vom Anmelder in der Beschreibung dargelegt (siehe Seite 2, letzter Absatz). Ebenso ist dem Fachmann bekannt, daß Zellen auf mehrere Arten gezüchtet werden können, z.B. auf einer Kulturplatte oder in einer Kulturlösung,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wobei das Wachstum von der Zugabe von Nähr- oder Wachstumsfaktoren abhängt.

In Dokument D1 wird die gesteuerte Zugabe von Wachstumsfaktoren erwähnt (siehe Punkt 4.1 oben). Es ist damit implizit, daß das in D1 beschriebene System geeignet ist, den Einfluß der Zugabe von Substanzen auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen.

Es wäre daher für den Fachmann naheliegend, die Methode von Anspruch 1 zu verwenden, um die Auswirkungen von Wirkstoffen auf das Zellwachstum zu erkunden.

In dem Antwortschreiben, datiert 8.2.2001, Seite 4, argumentiert der Anmelder, daß sich in D1 kein Hinweis darauf findet, daß Zellen gezielt durch die Zugabe von Substanzen getötet werden. Dieser Aspekt der Methode der gegenwärtigen Anmeldung spiegelt sich jedoch nicht im Wortlaut von Anspruch 1 wieder, der sich lediglich auf das Testen von Wirkstoffen (d.h. sowohl positive als auch negative Modulatoren) auf Zellen bezieht und aus der Formulierung "Überwachen der Zellvitalität" nicht hervorgeht, daß das Absterben von Zellen detektiert werden soll.

Der Gegenstand von Anspruch 1 kann daher nicht als erfinderisch im Sinne von Artikel 33(3) angesehen werden.

- 4.3 Die abhängigen Ansprüche 2 und 4-24 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in Bezug auf erfinderische Tätigkeit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

Der Gegenstand der Ansprüche 2, 4, 7-9, 11, 12, und 17-20 ist bereits in Dokument D1 offenbart (siehe Punkt 4.1 oben).

Die Reduktion der Zellkulturkammern auf kleine Volumina (Ansprüche 5, 6), das Abführen gasförmiger Stoffwechselprodukte (Anspruch 16), sowie die Überwachung des Systems mittels eines Sensors (Anspruch 23) ist aus Dokument D4 bekannt (Spalte 6, Zeile 66 - Spalte 7, Zeile 4; Spalte 7, Zeile 62 - Spalte 8, Zeile 8; Spalte 9, Zeilen 50-54).

Die Auswahl eines im Stand der Technik bekannten Nährmediums (Ansprüche 10 und 13), ebenso wie die Auswahl von geeigneten Kulturbedingungen (Ansprüche 14 und 15) erfordert keine erfinderische Tätigkeit.

THIS PAGE BLANK (HSPTO)

Die Verwendung eines Zellvitalitätsfarbstoffes, sowie dessen Detektion (Ansprüche 21, 22, und 24) ist ebenfalls eine im Stand der Technik bekannte Methode.

Ansprüche 2 und 4-24 könne daher nicht als erfinderisch im Sinne von Artikel 33(3) PCT angesehen werden.

- 4.4 Der Gegenstand von Anspruch 3 unterscheidet sich von der Lehre von Dokument D1 dadurch, daß als Zellkultur Tumorzelllinien eingesetzt werden.

Das diesem Anspruch zugrundeliegende Problem kann daher darin gesehen werden, eine Methode zur Verfügung zu stellen, bei der der Einfluß von Wirkstoffen auf spezifische, mit einer Krankheit assoziierte Zelllinien untersucht wird.

Die Kultivierung von Tumorzellen in einer Methode gemäß Anspruch 3 sowie die Untersuchung der Wirkung von Substanzen auf die Zellvitalität wird in dem der Prüfungsbehörde bekannten Dokumenten des Standes der Technik weder offenbart noch nahegelegt. Die dadurch erzielten Vorteile bei der Beurteilung des Einflusses von Wirksubstanzen auf besagte Zellen, wie vom Anmelder in der Beschreibung, Seiten 3 und 4, dargelegt, waren daher für den Fachmann ebenfalls nicht offensichtlich.

Anspruch 3 erfüllt damit die Erfordernisse von Artikel 33(3) PCT.

- 4.5 Anspruch 25 unterscheidet sich von dem in Dokument D1 offenbarten Stand der Technik dadurch, daß das Volumen des Zellkulturraumes höchstens 5 ml beträgt und daß die Mischung des Nährmediums aus mehr als einem Behälter erfolgt. Das diesem Anspruch zugrundeliegende Problem kann daher darin gesehen werden, eine Zellkulturvorrichtung mit einem unterschiedlichen Aufbau verglichen mit der in D1 offenbarten zur Verfügung zu stellen.

Vorrichtungen, die Zellkultur in kleinen Volumina ermöglichen, sind jedoch im Stand der Technik bekannt (siehe Punkt 4.3 und Dokument D3, Seite 13, Zeilen 11-15). Weiters handelt es sich bei dem Merkmal der Mischung eines Nährmediums aus separaten Behältern, wie bei Fermentiergeräten seit langem praktiziert, nur um eine von mehreren naheliegenden Möglichkeiten, aus denen der Fachmann ohne erfinderisches Zutun den Umständen entsprechend auswählen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Dazu ist auch anzumerken, daß unter einer "Vorrichtung zum in vitro Testen von

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zellen" lediglich eine Vorrichtung zu verstehen ist, die sich zur Durchführung dieser Tests eignet, und besagte Vorrichtung nicht durch die Methode charakterisiert ist, die damit durchgeführt wird (siehe auch PCT Richtlinien, C-III, 4.8).

Daher kann der Gegenstand von Anspruch 25 nicht als erfinderisch im Sinne von Artikel 33(3) PCT angesehen werden.

- 4.6 Die abhängigen Ansprüche 26-41, die sich auf spezielle Ausführungsformen der Vorrichtung von Anspruch 25 beziehen, können im Licht der Offenbarungen von Dokumenten D1 und D4, und dem allgemeinen Stand der Technik (siehe Punkte 4.1 und 4.3) ebenfalls nicht als erfinderisch im Sinne von Artikel 33(3) PCT angesehen werden.
- 4.7 Ansprüche 42 und 43, die sich auf einen modularen Aufbau der Vorrichtung von Anspruch 25 beziehen, sind nicht erfinderisch im Sinne von Artikel 33(3) PCT, da modulare Zellkultureinheiten bereits in Dokument D4 offenbart sind (siehe Abbildungen 7 und 9).
- 4.8 Ansprüche 44 und 45 scheinen ebenfalls nicht erfinderisch zu sein (Artikel 33(3) PCT), da die Überprüfung des Einflusses von Substanzen auf Zellen ein im Stand der Technik bekanntes Standardproblem ist..

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO99/28438	10.06.1999	26.11.1998	27.11.1997

Das oben zitierte Dokument könnte relevanter Stand der Technik für die Frage der Neuheit werden, falls die gegenwärtige Anmeldung in die Regionalphase eintritt. Die

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gründe dafür sind die folgenden:

Das Dokument WO99/28438 beschreibt eine Vorrichtung zur Kultivierung von hematopoietischen Zellen und deren Verwendung. Besagte Vorrichtung besteht aus einer Zellkulturkammer, deren obere und untere Wand aus einem Mikrosieb besteht, welches das Zu- und Abführen von Nährmedium ermöglicht. Das Nährmedium kann wiederverwendet werden (Seite 7, Zeilen 3-4). Weiters beinhaltet besagte Vorrichtung Kapillaren, die permeabel für gasförmige Stoffe sind, die damit in die Kulturkammer eingebracht werden können (Seite 5, Zeilen 4-6). Verschiedene Stoffe können dem Kulturmedium zugeführt werden, deren Mengen variiert werden können, z. B. Wachstumsfaktoren (Seite 9, Zeile 17 - Seite 10, Zeile 2; Seite 8, Zeilen 14-16). Ein solcher Bioreaktor kann ein Volumen von 1 cm³ bis 10 l haben (Seite 11, Zeilen 6-7). Als Beispiel wird eine Kammer mit 3.6 ml Volumen genannt, in die Zellen mit einer Dichte von 10⁶ Zellen/ml eingebracht werden. (Seite 13, Zeile 23-25). Zellwachstum kann mittels eines optischen Sensors überprüft werden (Seite 7, Zeilen 9-10). Die Temperatur wird über einen Thermostaten reguliert, z.B. auf 37°C (Seite 8, Zeile 35). Weiters kann der pH Wert, der Sauerstoffgehalt, CO₂ Gehalt kontrolliert werden (Seite 8, Zeilen 29-34). Auch hier ist anzumerken, daß unter einer "Vorrichtung zum in vitro Testen von Zellen" lediglich eine Vorrichtung zu verstehen ist, die sich zur Durchführung dieser Tests eignet, und besagte Vorrichtung nicht durch die Methode charakterisiert ist, die damit durchgeführt wird (siehe auch PCT Richtlinien, C-III, 4.8). Dokument WO99/28438 wäre deshalb neuheitsschädlich für die Gegenstand der Ansprüche 25-33, 37-40, und 44.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Bei dem in dem Anspruch 22 verwendeten Begriff "alamar Blue", handelt es sich um ein eingetragenes Warenzeichen, das keine klar umrissene Bedeutung hat, da es international nicht als Standardausdruck anerkannt ist (Artikel 6 PCT, siehe auch PCT Richtlinien, III-4.5b). Darüberhinaus ist nicht auszuschließen, daß das Erzeugnis, auf das verwiesen wird, während der Laufzeit des Patents geändert wird, seinen Namen aber beibehält.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

22

Anlage zur Eingabe vom 08.02.2001

Patentansprüche:**Verwendung eines**

1. ~~Verfahren zum in vitro Testen von Wirkstoffen an Zellen~~ umfassend mindestens die Schritte
 - a) zur Verfügung stellen eines Zellkulturbehälters mit einem Innenraum und einer Innenwand und mit einem im Innenraum angeordneten ersten und zweiten Membransystem, wobei zwischen den Membransystemen und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet ist,
 - b) Vorlegen von Zellen als Zellkultur und eines Zellkulturmediums im Zellkulturraum,
 - c) Zuführen eines flüssigen Nährmediums in den Zellkulturraum und Abführen von Stoffwechselprodukten aus dem Zellkulturraum mittels des ersten Membransystems,
 - d) Zuführen mindestens eines gasförmigen Mediums in den Zellkulturraum mittels des zweiten Membransystems,
 - e) Zudosieren von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum, wobei das Zudosieren gemäß einem vorgegebenen Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlauf erfolgt und
 - f) Überwachen der Zellvitalität.

zum in vitro Testen v n Wirkstoffen an Zellen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

23

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Wirkstoffe Cytostatika, Antibiotika, Cytokine, Wachstumsfaktoren oder antivirale Agentien eingesetzt werden.
3. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellkultur Primärzellen eingesetzt werden.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellkultur Tumorzelllinien eingesetzt werden.
5. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von mindestens 0,1 ml und höchstens 5 ml hat.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von mindestens 0,3 ml und höchstens 3,0 ml hat.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als erstes Membransystem mindestens eine semipermeable Membran oder mindestens eine hydrophile mikroporöse Membran und als zweites Membransystem mindestens eine Gastransfermembran eingesetzt wird.
8. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und zweite Membransystem aus Hohlfasern besteht, die in mehreren Lagen schichtförmig übereinander angeordnet sind.
9. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zellkulturbehälter verwendet wird, der einen abnehmbaren Deckel aufweist und das Vorlegen der Zellkultur durch Einstellen der gewünschten Zelldichte im Zellkulturmedium, Öffnen des Deckels des Zellkultur-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

24

behälters, Einpipettieren des gewünschten Volumens der Zellsuspension in den Innenraum des Zellkulturbehälters und Verschließen des Zellkulturbehälters mit dem Deckel geschieht.

10.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet wird.

11.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellkulturraum vorgelegt werden.

12.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass jede Zelle einen mittleren Abstand von 0 μm bis 600 μm zur jeweils nächstgelegenen Membran des ersten und zweiten Membransystems aufweist.

13.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als flüssiges Nährmedium RPMI 1640 eingesetzt wird.

14.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das gasförmige Medium einen pO_2 von 0 bis 160 mmHg und einen pCO_2 von 0 bis 115 mmHg aufweist.

15.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Zellkulturmedium einen Bicarbonatpuffer enthält und der pCO_2 im zugeführten gasförmigen Medium so eingestellt wird, dass der pH-Wert des Zellkulturmediums zwischen 6,8 und 7,8 liegt.

16.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass gasförmig Stoffwechselprodukte mittels des zweiten Mem-



THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

25

bransystems aus dem Zellkulturraum entfernt werden.

17.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass einzelne Wirkstoffe und/oder Kombinationen mehrerer Wirkstoffe zeitversetzt zudosiert werden.

18.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffdosierung direkt oder über das erste Membransystem in den Zellkulturraum erfolgt.

19.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorgabe des Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlaufs durch die Permeabilitäten des ersten Membransystems, durch die Dauer der Wirkstoffzugabe und durch die Wirkstoffkonzentration geschieht.

20.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter auf einer Temperatur von 37 °C gehalten wird.

21.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellvitalität mittels eines Zellvitalitätsfarbstoffs überwacht wird.

22.Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellvitalitätsfarbstoff alamar Blue® dient.

23.Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellvitalität mit mindestens einem Sensor überwacht wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

26

24. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass ein Sensor für Fluoreszenz eingesetzt wird.

zum in vitro Testen von Wirkstoffen an Zellen

25. Vorrichtung umfassend einen zur Aufnahme einer Zellkultur in einem Zellkulturmedium geeigneten Zellkulturbehälter (1) mit einem Innenraum (2), wobei im Innenraum erste Mittel zur Zuführung mindestens eines Nährmediums und zweite Mittel zur Zuführung mindestens eines gasförmigen Mediums angeordnet sind, wobei die Mittel jeweils eine Zuführungsseite und eine Abführungsseite aufweisen, und wobei zwischen besagten Mitteln und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet ist, und wobei die ersten Mittel mit ihrer Zuführungsseite über eine Nährmediendosiereinheit (3) mit mindestens einem Nährmediumbehälter (4) in Fluidverbindung stehen, und die zweiten Mittel mit ihrer Zuführungsseite über eine Gasdosiereinheit (5) mit mindestens einem Gasvorratsbehälter (6) in Fluidverbindung stehen, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von höchstens 5 ml und mindestens 0,1 ml hat, dass die Vorrichtung des Weiteren Mittel (7), (8), (9), (9a), (9b) und (9c) zur Zuführung von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum und Mittel zum Vorgeben eines Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlaufs im Zellkulturraum enthält.
26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Mittel mit ihrer Abführungsseite mit einem Abfallbehälter (10) in Fluidverbindung stehen.
27. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Mittel mit ihrer Abführungsseite über eine Rezirkulationsleitung (11) mit dem mindestens einen Nährmedienbehälter (4) in Fluidverbindung stehen.
28. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Mittel aus mindestens einer für die Zuführung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

27

flüssiger Nährmedien geeigneten Membran bestehen.

29. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die zweiten Mittel aus mindestens einer für den Gasaustausch geeigneten Membran bestehen.
30. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter (1) einen Boden und einen Deckel aufweist, welche den Innenraum begrenzen, einander gegenüber liegen und aus einem transparenten Material bestehen.
31. Vorrichtung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass im Boden des Zellkulturbehälters (1) ein Heizsystem integriert ist.
32. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Membran der ersten Mittel eine semi-permeable Membran oder eine hydrophile mikroporöse Membran ist.
33. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Membran der zweiten Mittel eine Oxygenationsmembran ist.
34. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen der ersten und der zweiten Mittel Hohlfasern sind.
35. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlfasern in mehreren Lagen schichtförmig übereinander im Innenraum angeordnet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

28

36. Vorrichtung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass der maximale Abstand der die jeweiligen Mittel ausbildenden Hohlfasern untereinander zwischen 50 μm und 600 μm liegt.
37. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkultorraum ein Volumen von 0,3 ml bis 3,0 ml hat.
38. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Wirkstoffzuführung aus mindestens einem Wirkstoffvorratsbehälter (7), mindestens einer Wirkstoffdosiereinheit (8) und aus einem Leitungssystem (9) besteht, das den mindestens einen Wirkstoffvorratsbehälter (7) über jeweils eine Wirkstoffdosiereinheit (8) direkt (9a) oder über die ersten Mittel (9b) mit dem Zellkultorraum des Zellkulturbehälters (1) verbindet.
39. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung ein Mittel zur Überwachung der Zellvitalität umfaßt.
40. Vorrichtung nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zur Überwachung der Zellvitalität aus mindestens einem Sensor bestehen.
41. Vorrichtung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass der Sensor ein Fluoreszenz - Sensor ist.
42. Modulares Wirkstoffprüfsystem umfassend mindestens 2 Vorrichtungen gemäß Anspruch 25 bis 41.
43. Modulares Wirkstoffprüfsystem gemäß Anspruch 42 bestehend aus 6, 24 oder 96 Vorrichtungen gemäß den Ansprüchen 25 bis 41.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WO 00/53797

PCT/EP00/02011

29

44. Verwendung der Vorrichtung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 41 oder des modularen Wirkstoffprüfsystems gemäß einem der Ansprüche 42 oder 43 zum in vitro Test der Wirkung von Wirkstoffen auf Zellen.
45. Verwendung der Vorrichtung oder des modularen Systems gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Einfluß einer Pharmakokinetik auf die Vitalität von Zellen ermittelt wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :

C12Q 1/02, C12M 3/06

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53797

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

14. September 2000 (14.09.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02011

(22) Internationales Anmeldedatum: 8. März 2000 (08.03.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 10 540.5 9. März 1999 (09.03.99) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AKZO
NOBEL NV [NL/NL]; Postbus 9300, NL-6824 BM Arnhem
(NL).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GLÖCKNER, Herma
[DE/DE]; Dammsweg 5, D-63839 Kleinwallstadt (DE).
LEMKE, Horst-Dieter [DE/DE]; Dr.-Kittelweg 6, D-63785
Obermburg (DE). MEYER, Christoph [DE/DE]; Waldwiese
5, D-66123 Saarbrücken (DE).(74) Anwalt: FETT, Günter; Acordis AG, Kasinostrasse 19-21,
D-42103 Wuppertal (DE).(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.*

(54) Title: METHOD FOR THE IN VITRO TESTING OF ACTIVE INGREDIENTS, CORRESPONDING DEVICE AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM IN VITRO TESTEN VON WIRKSTOFFEN, VORRICHTUNG UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to a method for the in vitro testing of active ingredients in cells, which includes at least the following steps: provision of a cell culture dish having an inner chamber and an outer wall as well as a first and a second membrane system positioned in the inner chamber, a cell culture chamber being configured between the membrane systems and the inner wall of the inner chamber; introduction of a cell culture and a cell culture medium into the cell culture chamber; addition of a liquid nutrient medium to the cell culture chamber; removal of products of metabolism by means of the first membrane system; delivery of at least one gaseous medium to the cell culture chamber by means of the second membrane system; addition of at least one active ingredient into the cell culture chamber in accordance with a set active-ingredient concentration-time curve; and monitoring of cell vitality. The invention also relates to a device and to the use of said device for testing the effect of idarubicin on the leukaemic cell line CCRF CEM.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren zum in vitro Testen von Wirkstoffen an Zellen umfaßt mindestens die Schritte: zur Verfügung stellen eines Zellkulturbehälters mit einem Innenraum und einer Innenwand und mit einem im Innenraum angeordneten ersten und zweiten Membransystem, wobei zwischen den Membransystemen und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet wird; Vorlegen einer Zellkultur und eines Zellkulturmediums im Zellkulturraum; Zuführen eines flüssigen Nährmediums in den Zellkulturraum und Abführen von Stoffwechselprodukten mittels des ersten Membransystems; Zuführen mindestens eines gasförmigen Mediums in den Zellkulturraum mittels des zweiten Membransystems; Zuführen von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum, wobei das Zuführen gemäß einem eingestellten Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlauf erfolgt; und Überwachen der Zellvitalität. Desweiteren wird eine Vorrichtung und die Verwendung besagter Vorrichtung zum Test der Wirkung von Idarubicin auf die leukämische Zelllinie CCRF CEM beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**V r f a h r n zum in vitro Testen von Wirkstoffen,
Vorrichtung und deren Verwendung**

Akzo Nobel nv, Arnhem

* * *

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Testen von Wirkstoffen an Zellen in vitro, eine Vorrichtung und deren Verwendung.

Eine Testung von Wirkstoffen, wie z.B. Zytostatika, die in der Chemotherapie von Krebs verwendet werden, ist aus vielfältigen Gründen notwendig. Dabei ist zu unterscheiden, ob es sich um einen völlig neuen Wirkstoff handelt, oder um einen Wirkstoff, dessen Wirksamkeit bereits grundsätzlich bekannt ist. Bei einem unbekannten Wirkstoff muß zunächst die grundsätzliche Wirksamkeit z.B. im Rahmen eines Wirkstoffscreenings, die Dosis und die optimale Applikationsform, z.B. oral oder intravenös etc. ermittelt werden. Bei bereits bekannten Wirkstoffen werden z.B. mögliche Therapiestrategien überprüft und miteinander verglichen. Eine andere wichtige Fragestellung ist die patientenspezifische Testung bzw. die patientenspezifische Wirkung einer Substanz bei einem individuellen Patienten. Für jede dieser Fragestellungen stehen unterschiedliche Modellsysteme zur Verfügung.

Beim Wirkstoffscreening unbekannter Substanzen wird aus ethischen Gründen ausnahmslos nicht am Patienten, sondern mit Tiermodellen *in vivo* bzw. *in vitro* mit Zelllinien gearbeitet. Tiermodelle zum Screening unbekannter Cytostatika beruhen darauf, daß pro Behandlung des Empfängertieres humane Tumorzellproben in

Hohlfadendevices enkapsuliert und in das Empfängertier implantiert werden, wie dies in WO 94/25074 und US 5 676 924 beschrieben wird. Diese Vorgehensweise hat jedoch ihre Grenzen, da Tiermodelle naturgemäß schlecht zu automatisieren und mit einem hohen Aufwand und hohen Kosten verbunden sind. Zunehmend steht auch der Tierschutzgedanke einer Testung in Tiermodellen entgegen.

Fraglich ist auch die Übertragbarkeit der Testergebnisse an Versuchstieren, die zu- meist Nagetiere sind, auf den Menschen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Stoff- wechselunterschiede zwischen Mensch und Tierspezies, die im Tiermodell zu einer unterschiedlichen Pharmakokinetik führen. Im Rahmen dieser Erfindung wird unter Pharmakokinetik der dynamische Prozeß verstanden, in dem ein Wirkstoff mit unter- schiedlichen Kinetiken in den Organismus resorbiert, d.h. aufgenommen, verteilt, metabolisiert, d.h. umgesetzt und wieder ausgeschieden wird. Diese Vorgänge las- sen sich in vivo nicht unabhängig voneinander quantifizieren, da sie zeitlich überlap- pend und in gegenseitiger Abhängigkeit ablaufen. Im Kompendium Internistische Onkologie, Herausgeber: H.J. Schmoll, K. Höffgen, K. Possinger, Springer Verlag, (1996) werden deshalb mathematische Modelle gebraucht, welche die Verteilung ei- nes Medikamentes in fiktiven Körperräumen bzw. Kompartimenten beschreiben. Da- bei wirkt sich neben den Wirkstoffeigenschaften und dem Metabolismus insbesonde- re auch die Applikationsform auf die Pharmakokinetik der Substanz aus. Die Phar- makokinetik eines Wirkstoffes wird in vivo üblicherweise durch Messung der Serum- konzentration in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt.

Auch die Verwendung von in vitro Modellen zur Testung von Substanzen ist weit verbreitet. Dabei wird die Kultivierung von humanen Primärzellen in Monolayer-Kultu- ren zur patientenspezifischen Testung bevorzugt, um einen hohen Probendurchsatz zu erzielen. Eine derartige Vorgehensweise wird z.B. von G.J.L. Kaspers et al. in Blood (1997), Band 90, Nr. 7, Seiten 2723-29 und von R. Pieters in Blood (1990), Band 76, Nr. 11, Seiten 76, 2327-36 beschrieben. Der Nachteil der bekannten in vitro Verfahren ist, daß die dort verwendeten Mikrotiterplatten ein dreidimensional s

Wachstum der Zellen nicht zulassen. Solide Tumore z. B. entwickeln unterschiedliche Subpopulationen wahrscheinlich aufgrund von Gradienten im pH-Wert und der Nährstoffversorgung. Diese Gradienten verursachen regionale Variationen der Zellvitalität, des Metabolismus und der Sensivität gegenüber einer Behandlung mit Zytostatika. Es gibt Hinweise, daß maligne Zellen in einer dreidimensionalen, gewebeähnlichen Struktur ein anderes Verhalten gegenüber Zytostatika aufweisen, als Monolayer-Kulturen, wie aus J.J. Casciari et al., J. Natl. Cancer Inst. (1994), Band 86, Seiten 1846-52 und K.M. Nicholson et al., Ann. Oncology (1996), Band 7, Supplement 1, Abstract, hervorgeht.

Ein weiterer Nachteil der bekannten in vitro Verfahren ist, daß eine im menschlichen Organismus ablaufende Pharmakokinetik bisher in vitro nicht realisiert werden kann, d.h. nicht durch eine entsprechende in vitro Pharmakokinetik modelliert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird jedoch von einer in vitro Pharmakokinetik gesprochen. Darunter soll verstanden werden, daß sich die Wirkstoffkonzentration in der Umgebung der Zielzelle in Abhängigkeit von der Zeit in vitro auf gleiche Weise ändert, wie in der in vivo Umgebung der Zielzelle, wie etwa bei Leukämien im Serum, unabhängig davon, mit welchen Mitteln dieses Ziel erreicht wird. Primäres Kriterium sind dabei die Kurvenform und der absolute Wert der Wirkstoffkonzentration, während die Zeitachse gegenüber der in vivo Situation gerafft oder gestreckt sein kann.

Ein dritter Nachteil aller heute bekannten in vitro Verfahren zur Wirkstofftestung besteht darin, daß keine Kombinationstherapie nachgebildet werden kann. Dies ist deshalb von entscheidender Bedeutung, weil heute nur noch ausnahmsweise mit nur einem Cytostatikum, d.h. mit einer Monotherapie behandelt wird, die meisten Therapien also Kombinationstherapien sind, bei der eine zeitliche Abfolge von verschiedenen Cytostatika angewendet wird wie aus dem Kompendium Internistische Onkologie, Herausgeber H.J. Schmoll, K. Höffgen, K. Possinger, Springer Verlag, (1996) hervorgeht. Bei den Standardverfahren in vitro kann bisher nicht, wie im

Organismus, eine einmal in das Assay eingeführte Wirksubstanz wieder abgeführt werden, bevor die nächste Wirksubstanz verabreicht wird.

Alle drei genannten Nachteile führen dazu, daß derzeit in vitro das Verhalten realer Tumore gegenüber Chemotherapie nicht gut simuliert werden kann. Dies führt dazu, daß in der Fachwelt gravierende Zweifel am prognostischen Wert der bislang bekannten in vitro Verfahren zum Test von Wirkstoffen an Zellen bestehen.

Somit besteht ein Bedarf für ein in vitro Verfahren zum Test von Wirkstoffen an Zellen und für eine Vorrichtung, die zu besagtem Verfahren verwendet werden kann, wodurch die zuvor genannten Nachteile zumindest wesentlich verringert werden.

Daher stellt sich die vorliegende Erfindung die Aufgabe, ein in vitro Verfahren zum Test von Wirkstoffen an Zellen und eine Vorrichtung zu Verfügung zu stellen, die zu besagtem Verfahren verwendet werden kann, wodurch die zuvor genannten Nachteile zumindest wesentlich verringert werden und wodurch insbesondere eine Annäherung an die in vivo Pharmakokinetik durch eine entsprechende in vitro Pharmakokinetik ermöglicht wird und eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Wirkstoffen nachgebildet werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum in vitro Testen von Wirkstoffen an Zellen umfassend mindestens die Schritte

- a) zur Verfügung stellen eines Zellkulturbehälters mit einem Innenraum und einer Innenwand und mit einem im Innenraum angeordneten ersten und zweiten Membransystem, wobei zwischen den Membransystemen und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet wird,
- b) Vorlegen einer Zellkultur und eines Zellkulturmediums im Zellkulturraum,
- c) Zuführen eines flüssigen Nährmediums in den Zellkulturraum und Abführen von Stoffwechselprodukten mittels des ersten Membransystems,

- d) Zuführen mindestens eines gasförmigen Mediums in den Zellkulturraum mittels des zweiten Membransystems,
- e) Zudosieren von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum, wobei das Zudosieren gemäß einem eingestellten Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlauf erfolgt und
- f) Überwachen der Zellvitalität.

Unter den zu testenden Wirkstoffen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Stoffe zu verstehen, deren Wirkung auf die zu untersuchenden Zellen vor dem Test nicht oder nicht ausreichend bekannt ist. Hierbei kann es sich auch um gasförmigen Wirkstoffe, wie z.B. Atemgifte oder andere ggf. toxisch wirkende Gase handeln. Unter den vorstehend definierten Stoffen werden bevorzugt Cytostatika, Antibiotika, Cytokine, Wachstumsfaktoren oder antivirale Agentien eingesetzt. Darüber hinaus können grundsätzlich alle wie vorstehend definierten Stoffe hinsichtlich ihrer Wirkung auf Zellen getestet werden, wenn sich diese Stoffe in gelöster Form in den Zellkulturraum einbringen lassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren können Zellkulturen getestet werden, die bevorzugt aus Primärzellen oder aus Zelllinien bestehen, wobei besonders bevorzugt Tumorzelllinien eingesetzt werden. Das Volumen des Zellkulturraums beträgt vorzugsweise zumindest 0,3 ml und höchstens 2,0 ml, besonders bevorzugt liegt es zwischen 0,5 ml und 1,5 ml. Dadurch wird nur eine geringe Menge an Zellmaterial verbraucht, so dass z.B. einem Krebspatienten nur geringe Mengen an Zellen für das erfindungsgemäße Verfahren entnommen werden müssen.

Das im Innenraum des Zellkulturbehälters befindliche erste Membransystem besteht aus mindestens einer semipermeablen Membran, welche zur Zuführung eines flüssigen Nährmediums geeignet ist, d.h. einen kontinuierlichen Stofftransport durch die Membranwand aufgrund diffusiver oder konvektiver Transportmechanismen erlaubt. Je nach Erfordernis, d.h. je nachdem, ob ein diffusiver oder konvektiver Stofftransport des Nährmediums erforderlich ist, handelt es sich um eine Nanofiltrations-, Ul-

trafiltrations- oder Mikrofiltrationsmembran. Z.B. lassen sich Dialysemembranen wie etwa Cuprophan® oder hydrophile mikroporöse Membranen, wie z.B. mikroporöse Polyethersulfon-Membranen einsetzen. Das zweite im Innenraum des Zellkulturbehälters befindliche Membransystem besteht aus mindestens einer Gastransfermembran, insbesondere einer Oxygenationsmembran, wie sie z.B. als Oxyphan® im Handel erhältlich ist. Die Membranen des ersten und zweiten Membransystems sind bevorzugt Hohlfasermembranen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Zellkulturbehälter eingesetzt, bei dem das erste und zweite Membransystem aus Hohlfasern besteht, die in mehreren Lagen schichtförmig übereinander im Innenraum angeordnet sind.

Das Vorlegen der Zellkultur geschieht in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bei Verwendung eines Zellkulturbehälters mit Deckel durch Einstellen der Zelldichte im Zellkulturmedium, Öffnen des Deckels des Zellkulturbehälters, Einpipettieren des gewünschten Volumens der Zellsuspension in den Innenraum des Zellkulturbehälters und Verschließen des Zellkulturbehälters mit dem Deckel.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das Vorlegen der Zellkultur über eine Öffnung in der Seitenwand des Innenraums erfolgen, die z.B. mit einem an der Außenseite des Zellkulturbehälters befindlichen Anschluß für eine Spritze oder dergleichen versehen ist.

In einer dritten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das Vorlegen der Zellkultur über mindestens ein Septum erfolgen, über welches ein Zugang in den Inneraum des Zellkulturbehälters möglich ist.

Die Zellen können als Suspensionszellen oder als anheftungsbedürftige Zellen vorliegen, wobei Suspensionszellen in der Regel Zellen sind, die aus dem Blut ent-

stammen, und anheftungsbedürftige Zellen in der Regel Zellen sind, die dem Körpergewebe entstammen. Letztere können entweder als unzerteilte Gewebestücke direkt in den Innenraum des Zellkulturbehälters vorgelegt werden oder die Gewebestücke werden zuerst vereinzelt und danach wie Suspensionszellen vorgelegt. Für anheftungsbedürftige Zellen ist der Innenraum des Zellkulturbehälters vorteilhafterweise mit einer Oberfläche ausgestattet, an der die Zellen bevorzugt haften. Bevorzugt besteht diese Oberfläche aus proteinbeschichtetem Polycarbonat oder aus zusätzlich im Innenraum des Zellkulturbehälters eingebrachtem textilen Material aus Polyester.

Bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält der Zellkulturraum bevorzugt mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellkulturraum, besonders bevorzugt mindestens $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml Zellkulturraum. In einer besonders geeigneten Ausführungsform beträgt die Zelldichte im Zellkulturraum mehr als $5 \cdot 10^7$ Zellen pro ml Zellkulturraum. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Suspensionszellen mit einer Zelldichte von mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellkulturraum eingesetzt. Dadurch wird eine Annäherung an die Zelldichten wie im Blut möglich. Auch bei Verwendung von anheftungsbedürftigen Zellen wird das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise bei einer Zelldichte von mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellkulturraum durchgeführt, um nach entsprechendem Zellwachstum sich den Zelldichten des Körpergewebes anzunähern.

Vorteilhafterweise hat jede Zelle einen mittleren Abstand von 0 μm bis 600 μm zur jeweils nächstgelegenen Membran des ersten und zweiten Membransystems. Dadurch werden die Zellen gleichmäßig mit Nährmedium und Gas versorgt. Gleichzeitig werden die Stoffwechselprodukte gleichmäßig wieder abgeführt, so dass insgesamt ein Zustand in der Zellkultur simuliert wird, der den in vivo Verhältnissen ähnelt.

Als flüssiges Nährmedium bzw. als Zellkulturmedium können Medien eingesetzt werden, wie sie üblicherweise zur Versorgung von Zellen mit Nährstoffen bzw. zur Züchtung von Zellen verwendet werden. Bevorzugt wird RPMI 1640 eingesetzt. In

einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein RPMI 1640 und fötales Kälberserum enthaltendes Nährmedium eingesetzt.

Als gasförmiges Medium wird bevorzugt ein Gasgemisch eingesetzt, das einen Sauerstoff-Partialdruck pO_2 von 0 bis 160 mmHg und einen Kohlendioxid-Partialdruck pCO_2 von 0 bis 115 mmHg aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält das Zellkulturmedium einen Bicarbonatpuffer und der pCO_2 im zugeführten gasförmigen Medium wird so eingestellt, dass der pH-Wert des Zellkulturmediums zwischen 6,8 und 7,8 liegt.

Die gewünschte Zusammensetzung des gasförmigen Mediums kann dadurch eingestellt werden, dass das erfindungsgemäße Verfahren in einem Raum durchgeführt wird, worin diese Zusammensetzung herrscht. In diesem Fall erfolgt die Zufuhr des gasförmigen Mediums über einen Steril-Filter in das zweite Membransystem.

Das zweite Membransystem läßt sich mit Vorteil auch zur Entfernung gasförmiger Stoffwechselprodukte einsetzen, wenn es im cross-flow Modus betrieben wird und mit einer Gaszuführleitung und einer Gasabführleitung verbunden ist.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens werden einzelne Wirkstoffe und/oder Kombinationen mehrerer Wirkstoffe zeitversetzt zudosiert. Somit kann z.B. ein einzelner Wirkstoff über die Zeit verteilt in mehreren aufeinanderfolgenden Dosen verabreicht werden oder es können verschiedene einzelne Wirkstoffe zeitversetzt dem Zellkulturmedium zudosiert werden. Ebenso kann eine Abfolge von Wirkstoffkombinationen zeitversetzt zudosiert werden, wobei die Wirkstoffkombinationen in ihrer Zusammensetzung gleich bleiben oder variieren können. Schließlich können im Verfahren der vorliegenden Erfindung auch Einzelwirkstoffe und Wirkstoffkombinationen der vorstehend beschriebenen Art zeitversetzt zudosiert werden.

Die Wirkstoffzuführung kann direkt oder über das erste Membransystem, bzw. für den Fall, dass es sich um einen gasförmigen Wirkstoff handelt, über das zweite

Membransystem in den Zellkulturraum erfolgen. Bei der Zuführung des Wirkstoffs über das erste Membransystem wird der Wirkstoff in den Nährmedienstrom eingespeist und tritt mit dem Nährmedium über die Membranen des ersten Membransystems in den Zellkulturraum ein. Bei Zuführung eines gasförmigen Wirkstoffs über das zweite Membransystem wird dieser in das gasförmige Medium eingespeist und tritt mit dem gasförmigen Medium über die Membranen des zweiten Membransystems in den Zellkulturraum ein. Dies bedeutet natürlich, dass die Membranen der beiden Membransysteme für den jeweiligen Wirkstoff durchlässig sein müssen. Bei Zugabe des Wirkstoffs über das erste bzw. zweite Membransystem läßt sich der Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlauf beispielsweise durch die Permeabilität des ersten bzw. zweiten Membransystems, durch die Dauer der Wirkstoffzugabe und durch die Wirkstoffkonzentration einstellen. Die vorstehend beschriebenen Verfahrensweisen erlauben also die Simulation verschiedenster Pharmakokinetiken von Einzelwirkstoffen und/oder Wirkstoffkombinationen. Z.B. kann die Wirkstoffzugabe analog einer Dauerinfusion rampenförmig oder analog einer intravenösen Verabreichung peakförmig erfolgen.

Während des Wirkstofftestes wird der Zellkulturbehälter auf einer für das Kultivieren der Zellen geeigneten Temperatur gehalten, vorzugsweise auf 37 °C.

Unter Überwachung der Zellvitalität wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Überwachung der Stoffwechselaktivität, der Proliferation, der Apoptose oder allgemein des Zelltodes verstanden.

Zur Überwachung der Zellvitalität dient in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Zellvitalitätsfarbstoff. Besonders bevorzugt wird alamar Blue®. Diese Substanz kann über das Nährmedium und das erste Membransystem dem Zellkulturraum zugeführt werden. Alamar Blue® dringt durch die Membranen der Zellen ins Zellinnere und wird dort durch den Zellstoffwechsel in einen Fluoreszenzfarbstoff umgewandelt. Daher kann die Menge des solchermaßen gebildeten Fluoreszenzfarbstoffs als Maß für die Zellvitalität benutzt werden und mit

einem Fluoreszenzsensor entweder on-line oder nach Probennahme im Nährmedium nachgewiesen werden. Von besonderem Vorteil ist, dass eine Probennahme im Zellkulturraum nicht erforderlich ist, sondern im Flüssigkeitsstrom erfolgen kann, der den Zellkulturbehälter verläßt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass über das erste Membransystem der Zellvitalitätsfarbstoff nicht nur zugeführt, sondern auch vollständig wieder abgeführt werden kann, wodurch jede Störung der Zellkultur durch den Farbstoff korrigierbar und umkehrbar ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann zur Überwachung der Zellvitalität mindestens ein Sensor eingesetzt werden, der Informationen über den Zustand der Zellen liefert. Vorzugsweise handelt es sich hierbei um miniaturisierte Sensoren zur Bestimmung der Proliferation, Vitalität, Apoptose oder allgemein des Zelltodes. Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Sensor für Fluoreszenz.

Im erfindungsgemäßen Verfahren können zur Prozessüberwachung geeignete Sensoren eingesetzt werden. Vorzugsweise werden Sensoren zur Überwachung von Temperatur, pH, Partialdruck von Sauerstoff pO_2 , oder Kohlendioxid pCO_2 , Glucose oder Lactat eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Sensoren in den Innenraum des Zellkulturbehälters als Mikrosensoren integriert, wodurch es zu keinem störenden Einfluß der Sensoren auf die Zellkultur kommt. Auch können einer oder mehrere der genannten Sensoren im Zellkulturraum oder im Nährmedium eingesetzt und die Sensorsignale on-line verfolgt werden. So können beispielsweise pH, pO_2 , Glucose und Lactat gleichzeitig gemessen werden. An Stelle oder additionell zur eben beschriebenen on-line Sensorik sind weitere bevorzugte analytische Methoden im erfindungsgemäßen Verfahren Methoden zur Endpunktsbestimmung wie etwa das MTT-Assay (Mitochondriale Reduktion von Tetrazoliumfarbstoff) oder die Durchflußcytometrie.

Die Aufgabe wird des Weiteren durch eine Vorrichtung gelöst, die einen zur Aufnahme einer Zellkultur in einem Zellkulturmedium geeigneten Zellkulturbehälter mit einem Innenraum umfaßt, wobei im Innenraum erste Mittel zur Zuführung mindestens

eines Nährmediums und zweite Mittel zur Zuführung mindestens eines gasförmigen Mediums angeordnet sind, wobei die Mittel jeweils eine Zuführungsseite und eine Abführungsseite aufweisen, und wobei zwischen besagten Mitteln und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet ist, und wobei die ersten Mittel mit ihrer Zuführungsseite über eine Nährmediendosiereinheit mit mindestens einem Nährmediumbehälter in Fluidverbindung stehen, und die zweiten Mittel mit ihrer Zuführungsseite über eine Gasdosiereinheit mit mindestens einem Gasvorratsbehälter in Fluidverbindung stehen, und wobei die Vorrichtung dadurch gekennzeichnet ist, dass der Zellkulturraum ein Volumen von höchstens 5 ml und mindestens 0,1 ml hat, dass die Vorrichtung desweiteren Mittel zur Zuführung von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum und Mittel zum Vorgeben eines Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlaufs im Zellkulturraum enthält.

In einer bevorzugter Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung stehen die ersten Mittel mit ihrer Abführungsseite mit einem Abfallbehälter in Fluidverbindung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stehen die ersten Mittel mit ihrer Abführungsseite über eine Rezirkulationsleitung mit dem mindestens einen Nährmedienbehälter in Fluidverbindung. In der Leitung zwischen der Abführungsseite der ersten Mittel und dem Abfallbehälter kann ein Gerät installiert sein, das bestimmte Stoffwechselprodukte isolieren oder detektieren kann.

Die im Innenraum des Zellkulturbehälters befindlichen ersten Mittel bestehen vorzugsweise aus mindestens einer für die Zuführung flüssiger Nährmedien geeigneten Membran.

Die mindestens eine Membran der ersten Mittel besteht bevorzugt aus einer semi-permeablen Membran, welche zur Zuführung eines flüssigen Nährmediums geeignet ist, d.h. einen kontinuierlichen Stofftransport durch die Membranwand aufgrund diffuser oder konvektiver Transportmechanismen erlaubt. Je nach Erfordernis, d.h. je

nachdem, ob ein diffusiver oder konvektiver Stofftransport des Nährmediums erforderlich ist, handelt es sich um eine Nanofiltrations-, Ultrafiltrations- oder Mikrofiltrationsmembran. Z.B. lassen sich Dialysemembranen wie etwa Cuprophan® oder hydrophile mikroporöse Membranen, wie z.B. mikroporöse Polyethersulfon-Membranen einsetzen.

Die im Innenraum des Zellkulturbehälters befindlichen zweiten Mittel bestehen vorzugsweise aus mindestens einer für den Gasaustausch geeigneten Membran.

Die mindestens eine Membran der zweiten Mittel bestehen vorzugsweise aus einer Oxygenationsmembran, besonders bevorzugt aus mindestens einer Oxyphan® Membran.

Erfindungsgemäß stehen die zweiten Mittel mit einem Gasvorratsbehälter in Fluidverbindung. Hierbei kann der Gasvorratsbehälter aus dem Gasraum z.B. eines Brutschranks bestehen und Gasraum und zweite Mittel sind über einen gasdurchlässigen Sterilfilter in Kontakt. In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung stehen die zweiten Mittel über mindestens eine Gasdosiereinheit mit mindestens einem unter Gasüberdruck stehenden Gasvorratsbehälter in Fluidverbindung. Hierdurch lassen sich auf einfache Weise unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Gaskomponenten einstellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind die Membranen der ersten und der zweiten Mittel als Hohlfasern ausgebildet.

Besonders bevorzugt sind die Hohlfasern in mehreren Lagen schichtförmig übereinander im Innenraum angeordnet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt der maximale Abstand der die jeweiligen Mittel ausbildenden Hohlfasern untereinander zwischen 50 µm und 600 µm.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist der Zellkulturbehälter einen Boden und einen Deckel auf, welche den Innenraum begrenzen, einander gegenüber liegen und aus einem transparenten Material bestehen. Die Transparenz von Boden und Deckel erlaubt eine mikroskopische Beobachtung der Zellen während des Wirkstofftests.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist im Boden ein zur Thermostatisierung des Zellkulturbehälters auf 37 °C geeignetes Heizsystem, z.B. in Form einer Heizfolie, integriert, die eine hinreichende Transparenz für die beispielsweise mikroskopische Betrachtung der Zellkultur zuläßt.

Der Zellkulturraum hat bevorzugt ein Volumen von 0,3 ml bis 3,0 ml. Der Vorteil dieser Miniaturisierung besteht in einem besonders geringen Verbrauch an Zellen, Wirkstoffen, flüssigen und gasförmigen Medien.

Die in der erfindungsgemäßen Vorrichtung bevorzugten Mittel zur Wirkstoffzuführung bestehen aus mindestens einem Wirkstoffvorratsbehälter, mindestens einer Wirkstoffdosiereinheit und aus einem Leitungssystem, das den mindestens einen Wirkstoffvorratsbehälter über jeweils eine Wirkstoffdosiereinheit direkt oder über die ersten Mittel mit dem Zellkulturraum des Zellkulturbehälters verbindet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung bestehen die Mittel zum Vorgeben eines Wirkstoff-Konzentrations-Zeitverlaufs im Zellkulturraum in den Permeabilitäten der Membranen der ersten Mittel.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erfindungsgemäße Vorrichtung ein Mittel zur Überwachung der Zellvitalität.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung enthält als Mittel zur Überwachung der Zellvitalität mindestens einen Sensor, der geeignet ist, Informationen über den Zustand der Zellkultur zu liefern. Vorzugsweise

handelt es sich hierbei um miniaturisierte Sensoren zur Bestimmung der Proliferation, Vitalität, Apoptose oder allgemein des Zelltodes. Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Sensor für Fluoreszenz.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann zur Prozessüberwachung geeignete Sensoren enthalten, wobei es sich vorzugsweise um Sensoren für Temperatur, pH, Partialdruck von Sauerstoff pO_2 , oder Kohlendioxid pCO_2 , Glucose- oder Lactat handelt, die im Innenraum des Zellkulturbehälters angebracht sind.

Dabei können die genannten Sensoren einzeln oder in Kombination im Innenraum des Zellkulturbehälters angeordnet sein.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird des Weiteren durch ein modulares Wirkstoffprüfsystem gelöst, welches mindestens 2 der erfindungsgemäßen Vorrichtungen umfaßt.

Vorzugsweise umfaßt das modulare Wirkstoffprüfsystem 6, 24 oder 96 der erfindungsgemäßen Vorrichtungen, welche in geeigneter Weise zu einem modularen Aufbau angeordnet sind.

Schließlich wird die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung oder des erfindungsgemäßen Wirkstoffprüfungssystems zum in vitro Test der Wirkung von Wirkstoffen auf Zellen gelöst.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. das erfindungsgemäße modulare Wirkstoffprüfsystem läßt sich hervorragend zur Ermittlung des Einflusses der Pharmakokinetik auf die Vitalität von Zellen verwenden.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Zeichnungen und des Beispiels näher erläutert. Es zeigen in vereinfachter schematischer Darstellung:

Figur 1: Flußschema einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Figur 2a: Querschnitt eines modularen Wirkstoffprüfsystems mit erfindungsgemäßen Vorrichtungen,

Figur 2b: Querschnitt eines modularen Wirkstoffprüfsystems mit drei übereinander angeordneten Ebenen mit erfindungsgemäßen Vorrichtungen und

Figur 3: Draufsicht auf ein modulares Wirkstoffprüfsystem umfassend sechs erfindungsgemäße Vorrichtungen.

Figur 4a: Drei als Profil 1 bis 3 bezeichnete Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verläufe.

Figur 4b: Darstellung der vitalen Zellen in vier verschiedenen Zellkulturbehältern wie vorgelegt (Inoculum) und wie geerntet (Zellernte).

Figur 1 zeigt einen Nährmedienbehälter 4, der über eine Leitung 14 und eine Nährmediendosiereinheit 3 mit der Zuführungsseite des im Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1 enthaltenen ersten Mittel fluidverbunden ist. Die Abführungsseite der im Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1 befindlichen ersten Mittel ist über die Leitung 14 mit einem Abfallbehälter 10 fluidverbunden. In der Leitung 14 zwischen der Abführungsseite der ersten Mittel und dem Abfallbehälter 10 befindet sich ein Gerät 12, das bestimmte Stoffwechselprodukte isolieren oder detektieren kann. Die Rezirkulationsleitung 11 ermöglicht ein Zurückleiten der aus der Abführungsseite der im Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1 befindlichen ersten Mittel abfließenden Flüssigkeit in den Nährmedienbehälter 4. Ein Wirkstoffvorratsbehälter 7 ist über ein Leitungssystem 9, eine Wirkstoffdosiereinheit 8 und eine Leitung 9b mit der Zuführungsseite der im Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1 befindlichen ersten Mittel fluidverbunden. In der eben beschriebenen Konfiguration gelangt ein Wirkstoff über die ersten Mittel in den Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1. Das Umschaltelement 9c und die Leitung

9a ermöglichen eine direkte Fluidverbindung zwischen einem Wirkstoffvorratsbehälter 7 und dem Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1. Mindestens ein Gasvorratsbehälter 6 ist über eine Gasdosiereinheit 5 mit der Zuführungsseite der im Innenraum 2 des Zellkulturbehälters 1 befindlichen zweiten Mittel fluidverbunden, deren Abführungsseite mit einer Gasabführleitung 6a verbunden ist.

Figur 2a zeigt im Querschnitt ein modulares Wirkstoffprüfsystem, das in einer Halterung 13 fixiert ist. Ein Nährmedienbehälter 4 ist mit einer Nährmedienleitung 14 über eine hier als Schlauchpumpe ausgeführte Nährmediendosiereinheit 3 mit der Zuführungsseite der ersten Mittel 1a im Innenraum des Zellkulturbehälters 1 fluidverbunden, wobei die Verbindung zwischen Nährmediendosiereinheit 3 und Zuführungsseite der ersten Mittel 1a durch die Leitungen 14 und 9b realisiert sind. Die Abführungsseite der ersten Mittel 1a im Innenraum des Zellkulturbehälters 1 ist über eine Leitung 14 mit einem Abfallbehälter 10 fluidverbunden. Jedoch können auch die Abführungsseiten mehrerer der erfindungsgemäßen Vorrichtungen mit einem gemeinsamen Abfallbehälter verbunden sein. Der Zellkulturbehälter 1 ist auf einer Grundplatte 15 plaziert und darauf mit einem Rastmechanismus befestigt. In der Grundplatte 15 integriert befindet sich eine Heizfolie, die geeignet ist, den Zellkulturbehälter und das Medium kurz vor seinem Eintritt in den Zellkulturbehälter auf die benötigte Temperatur, bevorzugt auf 37 °C, zu temperieren. Die Heizfolie kann aber auch in den Boden des Zellkulturbehälters 1 integriert sein, solange diese Integration eine hinreichende Transparenz des Zellkulturbehälterbodens zulässt, die für eine visuelle oder mikroskopische Beobachtung der Zellkultur von Vorteil ist. Vor und hinter dem Zellkulturbehälter 1 befinden sich Vorrichtungen 16, die für eine Probennahme geeignet sind und beispielsweise als Septum ausgeführt sein können. Der Wirkstoffvorratsbehälter 7 ist über das Leitungssystem 9, die Wirkstoffdosiereinheit 8 und die Leitung 9b mit der Zuführungsseite der im Zellkulturbehälter 1 befindlichen ersten Mittel 1a verbunden. Die Flüssigkeiten führenden Leitungen sind vorzugsweise Siliconschläuche mit einem Innendurchmesser von 1 mm.

Figur 2b zeigt im Querschnitt ein modulares Wirkstoffprüfsystem mit drei übereinander angeordneten Ebenen in je einer Halterung 13, die erfindungsgemäße Vorrichtungen enthält. Figur 2b verdeutlicht, dass mittels der modularen Anordnung der erfindungsgemäßen Vorrichtungen eine Vielzahl dieser Vorrichtungen bereitgestellt werden kann, wodurch sich eine Vielzahl von in vitro Wirkstofftests gleichzeitig durchführen lässt.

Figur 3 zeigt in Draufsicht ein modulares Wirkstoffprüfsystem in einer Halterung 13, die sechs erfindungsgemäße Vorrichtungen fixiert. Fünf dieser Vorrichtungen sind identisch mit den in Figur 2a beschriebenen Vorrichtungen. Die sechste, in Figur 3 ganz unten eingezeichnete Vorrichtung zeigt eine zur Kombinationstherapie geeignete Anordnung 17, deren drei Wirkstoffvorratsbehälter 18a, 18b und 18c über jeweils eigene Wirkstoffpumpen 19a, 19b und 19c mit der Zuführungsseite der ersten Mittel fluidverbunden sind. Zusammen mit dem Wirkstoffvorratsbehälter 7 und der Wirkstoffdosiereinheit 8 kann somit im Zellkulturbehälter der untersten erfindungsgemäßen Vorrichtung von Figur 3 eine Kombinationstherapie mit vier Wirkstoffen durchgeführt werden.

Die Vorrichtungen des modularen Wirkstoffprüfsystems schließen Nährmedien, Zellkulturen, Wirkstoffe und die Abfall-Lösungen gegenüber der Außenwelt ab. Alle mit Wirkstoff in Kontakt kommenden Teile der Vorrichtung sind bevorzugt als Einmal-Artikel ausgeführt. Daher kann mittels des bereits erwähnten Rastmechanismus jede Vorrichtung des modularen Systems einzeln aus besagtem System entfernt werden, ohne dass das Betriebspersonal mit den zum Teil hochtoxischen Wirkstoffen in Berührung kommt. Alle mit Nährmedium, Wirkstoff und Zellkultur in Kontakt kommenden Teile müssen sterilisierbar sein. Ein steriler Betrieb der Vorrichtung über 10 Tage ist nachgewiesen.

Somit wird deutlich, dass die modulare Anordnung der Vorrichtungen eine sehr große Zahl von Wirkstofftests mit verschiedenen Pharmakokinetiken und Wirkstoffkombinationen zulässt, wozu auch die Möglichkeit des modularen Systems beiträgt,

die Zahl und die Belegung der einzelnen Vorrichtungen in vielfältiger Weise zu wählen. Beispielsweise können Referenzvorrichtungen ohne Wirkstoffzugabe parallel zu Vorrichtungen mit Wirkstoffen betrieben werden. Der modulare Aufbau des Systems aus einzelnen Vorrichtungen hat gegenüber den konventionellen Zellkulturgefäßen (96-Well-, 24-Well und 6-Wellplatten) auch den Vorteil einer individuellen Manipulierbarkeit der einzelnen Vorrichtungen. Andererseits kann in verschiedenen Kanälen auch die gleiche Manipulation (gleiche Probe, gleiche Behandlung) durchgeführt werden (Mehrfachmessungen).

Ein aus 6 Vorrichtungen bestehendes modulares Wirkstoffprüfsystem wiegt weniger als 10 kg und kann problemlos von einer Person getragen werden. Wegen der geringen Abmessungen kann z.B. ein aus 24 Vorrichtungen bestehendes modulares Wirkstoffprüfsystem auch in einem handelsüblichen CO₂-Inkubator betrieben werden.

Zur Systemsteuerung, Probenidentifikation, Datenaufnahme und Datenauswertung dient vorzugsweise ein Personal Computer, an dessen Bildschirm die momentan anliegenden Meßwerte verfolgt werden können. Zudem ist ein Datenvergleich zwischen einzelnen Kanälen möglich. Die Auswertesoftware ist zur Trendanalyse ebenso fähig wie etwa zur Analyse der Differenz zwischen Referenz- und Wirkstoffkanälen. Die Ergebnisse können patientenbezogen ausgewertet und gespeichert werden.

Das folgende Beispiel zeigt, wie das modulare Wirkstoffprüfsystem zur Messung des Einflusses der Pharmakokinetik auf die Vitalität von Zellen verwendet werden kann.

Beispiel:

Die leukämische Zelllinie CCRF CEM wird in einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ pro ml Zellkulturmedium (RPMI 1640 und 10 Vol.% fötales Kälberserum bezogen auf RPMI1640) und in einem Volumen von 300 µl in vier Zellkulturbehälter eines erfindungsgemäßen modularen Wirkstoffprüfsystems aus 4 erfindungsgemäßen Vorrichtungen vorgelegt.

Das modulare Wirkstoffprüfsystem wird in einen Brutschrank eingeschlossen, in dem eine Temperatur von 37 °C und ein gasförmiges Medium bestehend aus 5 % CO₂, 74 % N₂ und 21 % O₂ vorliegt. Die Zufuhr des eben genannten gasförmigen Mediums erfolgt diffusiv über Sterilfilter in die zweiten als Oxyphan[®] ausgebildeten Membransysteme in den Innenraum der Zellkulturbehälter 1 bis 4. Als Nährmedium wird RPMI 1640 und 10 Vol.% fötales Kälberserum bezogen auf RPMI1640 eingesetzt. Für eine Zeitdauer von 24 h wird das Nährmedium mit einer Flußgeschwindigkeit von 7 ml/min rezirkuliert, wodurch die leukämischen Zelllinien über die als Cuprophan[®] - Hohlfasern ausgebildeten Membranen des ersten Membransystems mit Nährmedium versorgt werden. Nach 24 h Rezirkulation wird die Nährmedienzufuhr unterbrochen und das Zytostatikum Idarubicin in drei verschiedenen Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verläufen mit einer Flußgeschwindigkeit des Nährmediums von 0,2 ml pro Minute über die Cuprophan[®] -Membranen in die jeweiligen Zellkulturbehälter der erfindungsgemäßen Vorrichtungen wie im folgenden beschrieben zudosiert:

Die Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verläufe sind in Figur 4a) als Profile 1 bis 3 bezeichnet.

Profil 1: Eine Lösung von 0,20 µg Idarubicin pro ml des o.g. Zellkulturmediums wird in einem Zeitraum von 75 Minuten durch die Cuprophan[®] - Hohlfasern des Zellkulturbehälters 1 geleitet.

Profil 2: Eine Lösung von 0,50 µg Idarubicin pro ml des o.g. Zellkulturmediums wird in einem Zeitraum von 20 Minuten durch die Cuprophan[®] - Hohlfasern des Zellkulturbehälters 2 geleitet. Anschließend wird eine Lösung von 0,25 µg Idarubicin pro ml des o.g. Zellkulturmediums in einem Zeitraum von 20 Minuten durch die Cuprophan[®] - Hohlfasern des Zellkulturbehälters 2 geleitet.

Profil 3: Eine Lösung von 1,00 µg Idarubicin pro ml des o.g. Zellkulturmediums wird in einem Zeitraum von 15 Minuten durch die Cuprophan® - Hohlfasern des Zellkulturbehälters 3 geleitet.

Im den Innenraum des Zellkulturbehälters 4 wird kein Idarubicin zudosiert. Dieser Zellkulturbehälter dient als Kontrolle. Die jeweilige Zugabe des Wirkstoffs erfolgte dabei dergestalt, dass für alle der vorstehend beschriebenen Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verläufe die gleiche Fläche unter der jeweiligen Kurve (area under curve, AUC) resultierte. Nach der Zudosierung des Zytostatikums wird 1 h lang der Zellkulturbehälter mit frischem Nährmedium (RPMI 1640 und 10 Vol.% fötales Kälberserum bezogen auf RPMI 1640) gespült, indem das Nährmedium mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min durch die Membranen des ersten Membransystems und der aus den Membranen austretende Flüssigkeitsstrom in den jeweiligen Abfallbehälter geleitet wird. Danach wird die Nährmedienrezirkulation mit einer Flußgeschwindigkeit von 7 ml/min wieder aufgenommen. Nach 72 Stunden wird das bisher verwendete Nährmedium durch das gleiche aber frische Nährmedium ersetzt. Nach 96 h werden die Zellen aus den vier Zellkulturbehältern geerntet und mittels Trypanblau-Färbung die Zahl der vitalen Zellen und als Vitalität der prozentuale Anteil der Zahl der geernteten vitalen Zellen an der Gesamtzahl geernteter Zellen gemäß folgender Beziehung ermittelt:

$$\text{Vitalität} = (\text{Zahl der geernteten vitalen Zellen} / \text{Gesamtzahl geernteter Zellen}) \cdot 100(\%)$$

In Figur 4b ist hinter „Inoculum“ die Zahl der in den Zellkulturbehältern 1 bis 4 vorgelegten vitalen Zellen dargestellt. Da die Zellen in einem Volumen von 300 µl und in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ pro ml Zellkulturmedium vorgelegt wurden, beträgt die Zahl der vorgelegten vitalen Zellen in den Zellkulturbehältern 1 bis 4 $30 \cdot 10^5$. Hinter „Zellernte“ ist in Figur 4b die Zahl der vitalen Zellen aufgetragen, die nach der Zellernte erhalten wurden. Man erkennt, dass der Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlauf gemäß Profil 1 die Zahl der vitalen Zellen am stärksten verringerte.

Die Vitalitäten der Zellen aus den Zellkulturbehältern 1 bis 4 wurden mit folgendem Ergebnis ermittelt:

Zellkulturbehälter	Vitalität
1	29 %
2	36 %
3	47 %
4	90 %

Patentansprüche:

1. Verfahren zum in vitro Testen von Wirkstoffen an Zellen umfassend mindestens die Schritte
 - a) zur Verfügung stellen eines Zellkulturbehälters mit einem Innenraum und einer Innenwand und mit einem im Innenraum angeordneten ersten und zweiten Membransystem, wobei zwischen den Membransystemen und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet ist,
 - b) Vorlegen von Zellen als Zellkultur und eines Zellkulturmediums im Zellkulturraum,
 - c) Zuführen eines flüssigen Nährmediums in den Zellkulturraum und Abführen von Stoffwechselprodukten aus dem Zellkulturraum mittels des ersten Membransystems,
 - d) Zuführen mindestens eines gasförmigen Mediums in den Zellkulturraum mittels des zweiten Membransystems,
 - e) Zudosieren von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum, wobei das Zudosieren gemäß einem vorgegebenen Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlauf erfolgt und
 - f) Überwachen der Zellvitalität.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Wirkstoffe Cytostatika, Antibiotika, Cytokine, Wachstumsfaktoren oder antivirale Agentien eingesetzt werden.
3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellkultur Primärzellen eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellkultur Tumorzelllinien eingesetzt werden.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von mindestens 0,1 ml und höchstens 5 ml hat.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von mindestens 0,3 ml und höchstens 3,0 ml hat.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als erstes Membransystem mindestens eine semipermeable Membran oder mindestens eine hydrophile mikroporöse Membran und als zweites Membransystem mindestens eine Gastransfermembran eingesetzt wird.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und zweite Membransystem aus Hohlfasern besteht, die in mehreren Lagen schichtförmig übereinander angeordnet sind.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zellkulturbehälter verwendet wird, der einen abnehmbaren Deckel aufweist und das Vorlegen der Zellkultur durch Einstellen der gewünschten Zelldichte im Zellkulturmedium, Öffnen des Deckels des Zellkultur-

behälters, Einpipettieren des gewünschten Volumens der Zellsuspension in den Innenraum des Zellkulturbehälters und Verschließen des Zellkulturbehälters mit dem Deckel geschieht.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet wird.
11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellkulturraum vorgelegt werden.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass jede Zelle einen mittleren Abstand von 0 μm bis 600 μm zur jeweils nächstgelegenen Membran des ersten und zweiten Membransystems aufweist.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als flüssiges Nährmedium RPMI 1640 eingesetzt wird.
14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das gasförmige Medium einen pO_2 von 0 bis 160 mmHg und einen pCO_2 von 0 bis 115 mmHg aufweist.
15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Zellkulturmedium einen Bicarbonatpuffer enthält und der pCO_2 im zugeführten gasförmigen Medium so eingestellt wird, dass der pH-Wert des Zellkulturmediums zwischen 6,8 und 7,8 liegt.
16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass gasförmige Stoffwechselprodukte mittels des zweiten Mem-

bransystems aus dem Zellkulturraum entfernt werden.

17. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass einzelne Wirkstoffe und/oder Kombinationen mehrerer Wirkstoffe zeitversetzt zudosiert werden.
18. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffdosierung direkt oder über das erste Membransystem in den Zellkulturraum erfolgt.
19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorgabe des Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlaufs durch die Permeabilitäten des ersten Membransystems, durch die Dauer der Wirkstoffzugabe und durch die Wirkstoffkonzentration geschieht.
20. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter auf einer Temperatur von 37 °C gehalten wird.
21. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellvitalität mittels eines Zellvitalitätsfarbstoffs überwacht wird.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass als Zellvitalitätsfarbstoff alamar Blue[®] dient.
23. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellvitalität mit mindestens einem Sensor überwacht wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass ein Sensor für Fluoreszenz eingesetzt wird.
25. Vorrichtung umfassend einen zur Aufnahme einer Zellkultur in einem Zellkulturmedium geeigneten Zellkulturbehälter (1) mit einem Innenraum (2), wobei im Innenraum erste Mittel zur Zuführung mindestens eines Nährmediums und zweite Mittel zur Zuführung mindestens eines gasförmigen Mediums angeordnet sind, wobei die Mittel jeweils eine Zuführungsseite und eine Abführungsseite aufweisen, und wobei zwischen besagten Mitteln und der Innenwand des Innenraums ein Zellkulturraum ausgebildet ist, und wobei die ersten Mittel mit ihrer Zuführungsseite über eine Nährmediendosiereinheit (3) mit mindestens einem Nährmediumbehälter (4) in Fluidverbindung stehen, und die zweiten Mittel mit ihrer Zuführungsseite über eine Gasdosiereinheit (5) mit mindestens einem Gasvorratsbehälter (6) in Fluidverbindung stehen, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von höchstens 5 ml und mindestens 0,1 ml hat, dass die Vorrichtung des Weiteren Mittel (7), (8), (9), (9a), (9b) und (9c) zur Zuführung von mindestens einem Wirkstoff in den Zellkulturraum und Mittel zum Vorgeben eines Wirkstoffkonzentrations-Zeit-Verlaufs im Zellkulturraum enthält.
26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Mittel mit ihrer Abführungsseite mit einem Abfallbehälter (10) in Fluidverbindung stehen.
27. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Mittel mit ihrer Abführungsseite über eine Rezirkulationsleitung (11) mit dem mindestens einen Nährmedienbehälter (4) in Fluidverbindung stehen.
28. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten Mittel aus mindestens einer für die Zuführung

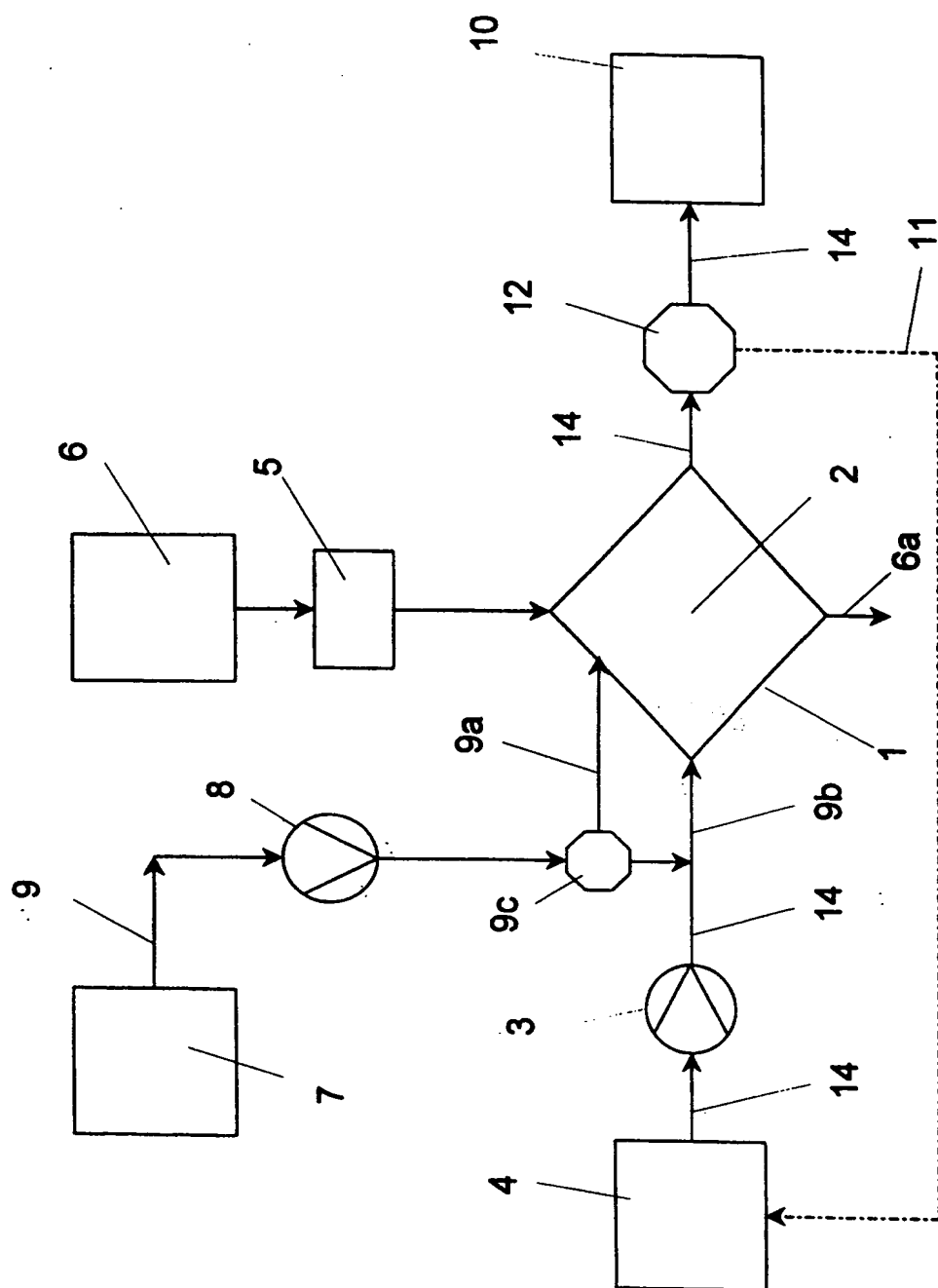
flüssiger Nährmedien geeigneten Membran bestehen.

29. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die zweiten Mittel aus mindestens einer für den Gasaustausch geeigneten Membran bestehen.
30. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter (1) einen Boden und einen Deckel aufweist, welche den Innenraum begrenzen, einander gegenüber liegen und aus einem transparenten Material bestehen.
31. Vorrichtung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass im Boden des Zellkulturbehälters (1) ein Heizsystem integriert ist.
32. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Membran der ersten Mittel eine semipermeable Membran oder eine hydrophile mikroporöse Membran ist.
33. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Membran der zweiten Mittel eine Oxygenationsmembran ist.
34. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Membranen der ersten und der zweiten Mittel Hohlfasern sind.
35. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlfasern in mehreren Lagen schichtförmig übereinander im Innenraum angeordnet sind.

36. Vorrichtung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass der maximale Abstand der die jeweiligen Mittel ausbildenden Hohlfasern untereinander zwischen 50 μm und 600 μm liegt.
37. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturraum ein Volumen von 0,3 ml bis 3,0 ml hat.
38. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Wirkstoffzuführung aus mindestens einem Wirkstoffvorratsbehälter (7), mindestens einer Wirkstoffdosiereinheit (8) und aus einem Leitungssystem (9) besteht, das den mindestens einen Wirkstoffvorratsbehälter (7) über jeweils eine Wirkstoffdosiereinheit (8) direkt (9a) oder über die ersten Mittel (9b) mit dem Zellkulturraum des Zellkulturbehälters (1) verbindet.
39. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung ein Mittel zur Überwachung der Zellvitalität umfaßt.
40. Vorrichtung nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zur Überwachung der Zellvitalität aus mindestens einem Sensor bestehen.
41. Vorrichtung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass der Sensor ein Fluoreszenz - Sensor ist.
42. Modulares Wirkstoffprüfsystem umfassend mindestens 2 Vorrichtungen gemäß Anspruch 25 bis 41.
43. Modulares Wirkstoffprüfsystem gemäß Anspruch 42 bestehend aus 6, 24 oder 96 Vorrichtungen gemäß den Ansprüchen 25 bis 41.

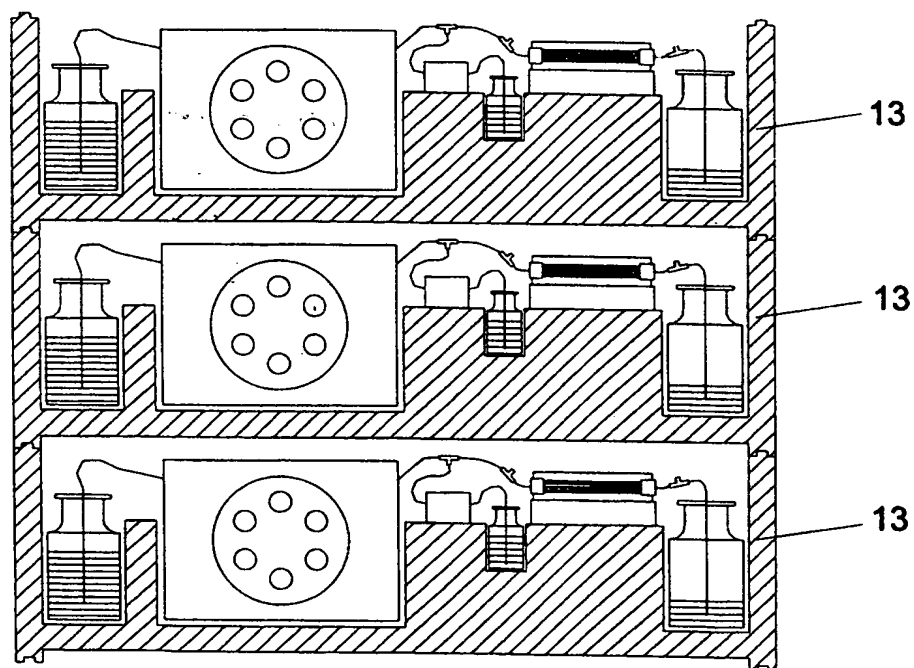
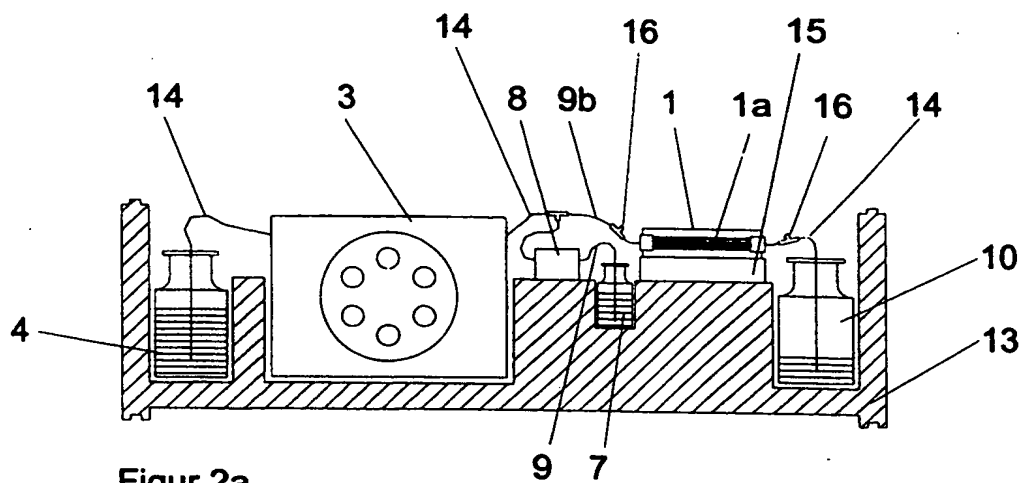
44. Verwendung der Vorrichtung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 41 oder des modularen Wirkstoffprüfsystems gemäß einem der Ansprüche 42 oder 43 zum in vitro Test der Wirkung von Wirkstoffen auf Zellen.
45. Verwendung der Vorrichtung oder des modularen Systems gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Einfluß einer Pharmakokinetik auf die Vitalität von Zellen ermittelt wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

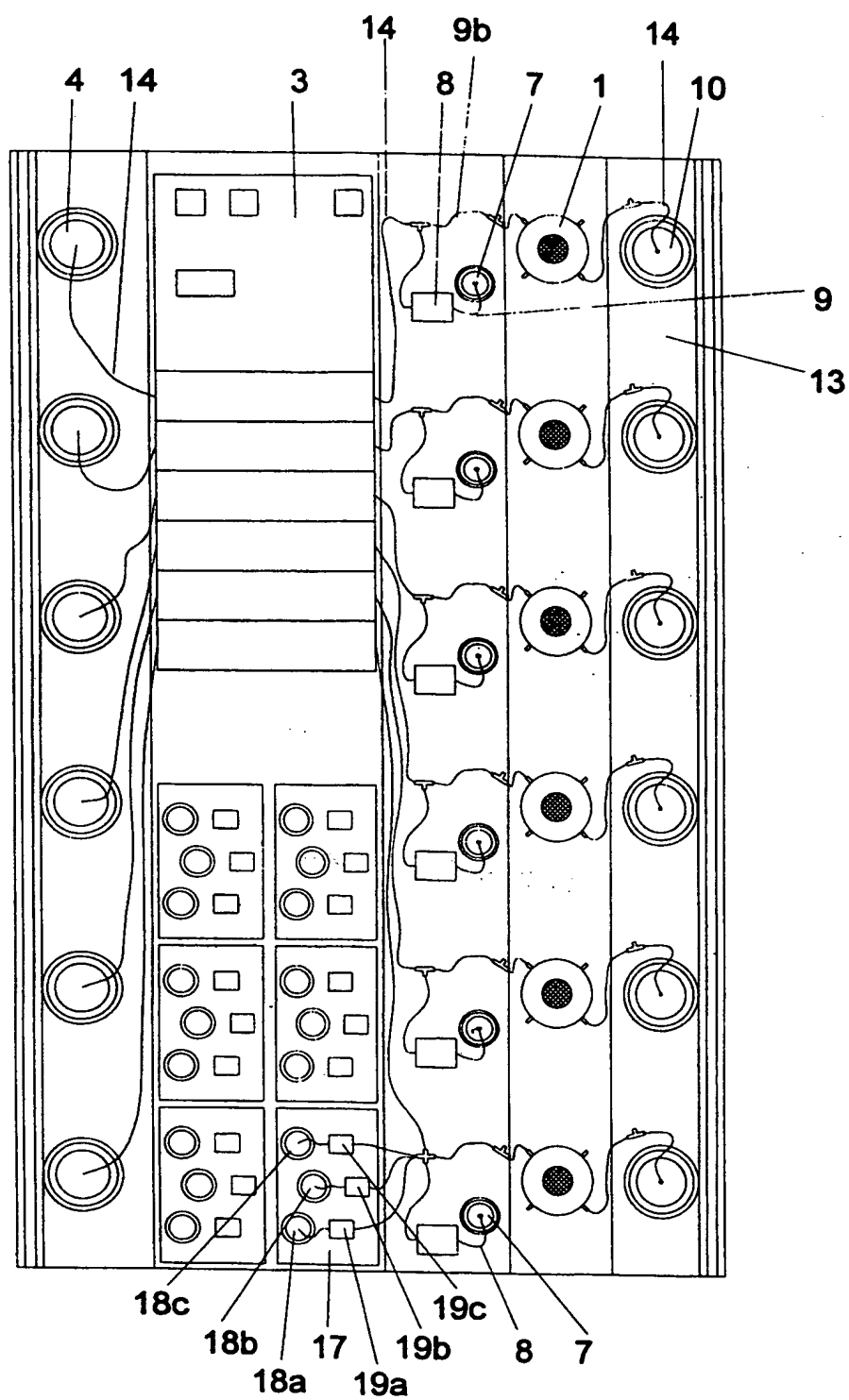


Figur 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

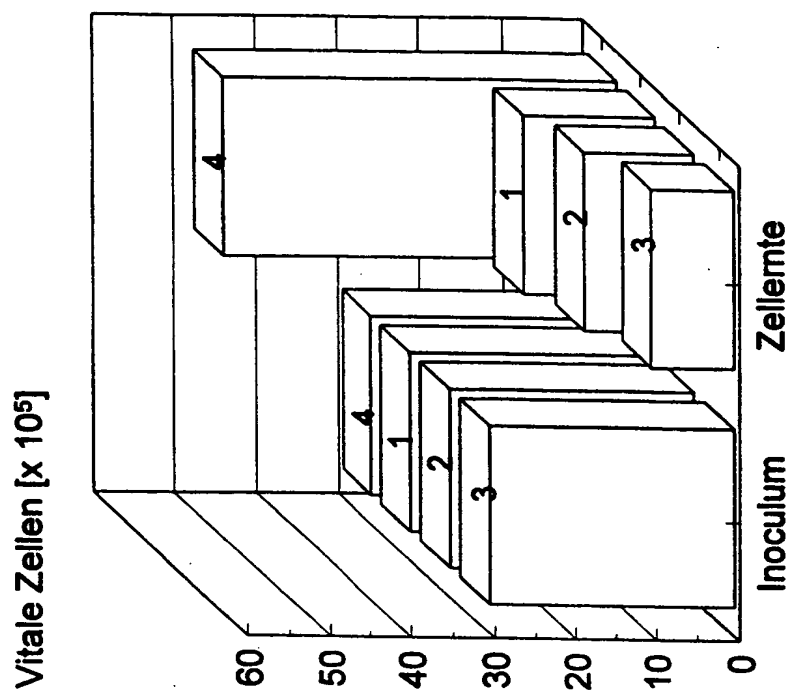


THIS PAGE BLANK (USPTO)

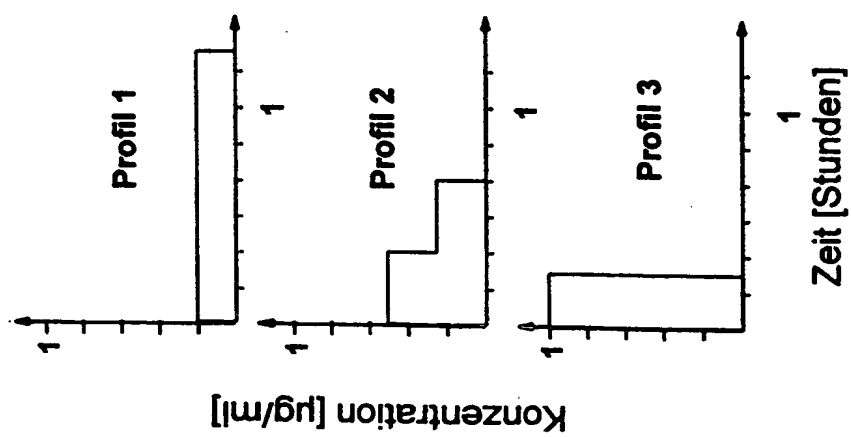


Figur 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Figur 4 b



Figur 4 a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/02 C12M3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12M B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DE 198 10 901 C (ASCALON GESELLSCHAFT FUER INN) 17 June 1999 (1999-06-17) claims	1-45
P,X	WO 99 28438 A (ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS ;DOUAY LUC (FR); BERTIN & CIE (FR);) 10 June 1999 (1999-06-10) claims	1-45
X	US 4 937 196 A (WRASIDLO WOLFGANG J ET AL) 26 June 1990 (1990-06-26) claims column 4, line 28 - line 36 column 5, line 12 - line 17 column 5, line 59 - line 66 column 9, line 13 - line 41 -/-	1-45

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2000

Date of mailing of the international search report

10/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02011

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 363 262 A (TERUMO CORP) 11 April 1990 (1990-04-11) claims 1-7 figure 3 page 2, line 29 - line 40 page 3, line 10 - line 18	1-45
X	US 4 661 458 A (BERRY ERIC S ET AL) 28 April 1987 (1987-04-28) claims	1-45
X	EP 0 180 165 A (DU PONT) 7 May 1986 (1986-05-07) claims page 5, line 1-13 figure 4	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02011

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19810901	C	17-06-1999	NONE	
WO 9928438	A	10-06-1999	FR 2771421 A	28-05-1999
US 4937196	A	26-06-1990	NONE	
EP 0363262	A	11-04-1990	JP 2092270 A	03-04-1990
US 4661458	A	28-04-1987	AT 34406 T	15-06-1988
			AU 3318084 A	29-03-1985
			DE 3471324 D	23-06-1988
			EP 0153405 A	04-09-1985
			IL 72823 A	29-02-1988
			JP 61500052 T	16-01-1986
			WO 8501062 A	14-03-1985
EP 0180165	A	07-05-1986	US 4748124 A	31-05-1988
			DK 496085 A	01-05-1986
			GR 852603 A	04-03-1986
			JP 1411059 C	24-11-1987
			JP 61108373 A	27-05-1986
			JP 62012992 B	23-03-1987

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02011

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/02 C12M3/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q C12M B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	DE 198 10 901 C (ASCALON GESELLSCHAFT FUER INN) 17. Juni 1999 (1999-06-17) Ansprüche	1-45
P, X	WO 99 28438 A (ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS ;DOUAY LUC (FR); BERTIN & CIE (FR);) 10. Juni 1999 (1999-06-10) Ansprüche	1-45
X	US 4 937 196 A (WRASIDLO WOLFGANG J ET AL) 26. Juni 1990 (1990-06-26) Ansprüche Spalte 4, Zeile 28 - Zeile 36 Spalte 5, Zeile 12 - Zeile 17 Spalte 5, Zeile 59 - Zeile 66 Spalte 9, Zeile 13 - Zeile 41 -/-	1-45

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/07/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Routledge, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 363 262 A (TERUMO CORP) 11. April 1990 (1990-04-11) Ansprüche 1-7 Abbildung 3 Seite 2, Zeile 29 - Zeile 40 Seite 3, Zeile 10 - Zeile 18	1-45
X	US 4 661 458 A (BERRY ERIC S ET AL) 28. April 1987 (1987-04-28) Ansprüche	1-45
X	EP 0 180 165 A (DU PONT) 7. Mai 1986 (1986-05-07) Ansprüche Seite 5, Zeile 1-13 Abbildung 4	1-45

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02011

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(r) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19810901 C	17-06-1999	KEINE	
WO 9928438 A	10-06-1999	FR 2771421 A	28-05-1999
US 4937196 A	26-06-1990	KEINE	
EP 0363262 A	11-04-1990	JP 2092270 A	03-04-1990
US 4661458 A	28-04-1987	AT 34406 T	15-06-1988
		AU 3318084 A	29-03-1985
		DE 3471324 D	23-06-1988
		EP 0153405 A	04-09-1985
		IL 72823 A	29-02-1988
		JP 61500052 T	16-01-1986
		WO 8501062 A	14-03-1985
EP 0180165 A	07-05-1986	US 4748124 A	31-05-1988
		DK 496085 A	01-05-1986
		GR 852603 A	04-03-1986
		JP 1411059 C	24-11-1987
		JP 61108373 A	27-05-1986
		JP 62012992 B	23-03-1987

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. PCT/EP00/02011

International Filing Date March 8, 2000

EUROPEAN PATENT OFFICE
PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference

(if desired) (12 characters maximum) AGW 2503 WO

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHOD FOR IN-VITRO TESTING OF ACTIVE SUBSTANCES, DEVICE, AND ITS USE

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

AKZO NOBEL NV

6824 BM Arnhem
Postbus 9300
NETHERLANDS

☐ This person is also inventor.

Telephone No.
263-66-4433

Facsimile No.
263-66-4096

Teleprinter No.
45438

State (that is, country) of nationality:

NL

State (that is, country) of residence:

NL

This person is applicant for the purposes of:

☐

all designated States

☒

all designated States except the United States of America

☐

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GLÖCKNER, Herma
Dammsweg 5
63839 Kleinwallstadt
DEUTSCHLAND

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

DE

State (that is, country) of residence:

DE

This person is applicant for the purposes of:

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

FETT, Gunter
ACORDIS AG
Kasinostrasse 19-21
42103 WUPPERTAL
DEUTSCHLAND

Telephone No.
(0202) 32-4213

Facsimile No.
(0202) 32-4224

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Continuation of Box No. III		FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> LEMKE, Horst-Dieter Dr. -Kittelweg 6 63785 Obernburg DEUTSCHLAND		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: DE		State <i>(that is, country)</i> of residence: DE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> MEYER, Christoph Waldwiese 5 66123 Saarbrücken DEUTSCHLAND		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality: DE		State <i>(that is, country)</i> of residence: DE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> (Empty)		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality:		State <i>(that is, country)</i> of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> (Empty)		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality:		State <i>(that is, country)</i> of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> (Empty)		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>	
State <i>(that is, country)</i> of nationality:		State <i>(that is, country)</i> of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> DZ Algeria | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> MA Morocco |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> DM Dominica | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> IN India | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> ZA South Africa |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Box No. VI PRIORITY CLAIM
☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 9 March 1999 (09/03/1999)	19910540.5	DEUTSCHLAND (DE)		
item (2)				
item (3)				

☐ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): _____

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

ISA / EP

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request :4
description (excluding
sequence listing part) :21
claims :8
abstract :1
drawings :4
sequence listing part
of description :
Total number of sheets :38

This international application is **accompanied** by the item(s) marked below:

1. ☐ fee calculation sheet
2. ☐ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☒ translation of international application into (language): English
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☐ other (specify):

Figure of the drawings which
should accompany the abstract:

Language of filing of the
international application: German

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

1) Herma GLOCKNER

2) Horst-Dieter LEMKE

3) Christoph MEYER

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application: March 8, 2000	2. Drawings: <input checked="" type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	
6. Transmittal of search copy delayed until search fee is paid <input type="checkbox"/>	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Method for In-vitro Testing of Active Substances, Device and Its Use

Claims:

1. Method for in-vitro testing of active substances on cells, comprising at least the following steps:

- a) providing a cell culture container with an internal chamber and an inside wall and with a first and second membrane system located on the inside wall, whereby a cell culture space was formed between the membrane systems and the inside wall of the interior chamber;
- b) providing cells as a cell culture and a cell culture medium in a cell culture space;
- c) supplying a fluid nutrient medium in the cell culture space and carrying away metabolic products from the cell culture space by means of the first membrane system;
- d) supplying at least one gaseous medium to the cell culture space by means of the second membrane system;
- e) adding at least one active substance to the cell culture space, with the addition taking place according to an adjusted active substance concentration-time curve; and
- f) monitoring cell vitality.

2. Method according to Claim 1, characterized in that cytostatics, antibiotics, cytokines, growth factors, or antiviral agents were used as the active substances.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3. Method according to one or more of Claims 1 or 2, characterized in that primary cells were used as the cell culture.
4. Method according to one or more of Claims 1 or 2, characterized in that tumor cell lines were used as the cell culture.
5. Method according to one or more of Claims 1 to 4, characterized in that the cell culture chamber has a volume of 0.1 ml minimum and 5 ml maximum.
6. Method according to Claim 5, characterized in that the cell culture chamber has a minimum volume of 0.3 ml and a maximum volume of 3.0 ml.
7. Method according to one or more of Claims 1 to 6, characterized in that at least one semipermeable membrane or at least one hydrophilic microporous membrane was used as the first membrane system and at least one gas transfer membrane was used as the second membrane system.
8. Method according to one or more of Claims 1 to 7, characterized in that the first and the second membrane system consist of hollow fibers stacked in multiple layers.
9. Method according to one or more of Claims 1 to 8, characterized in that a cell culture container is used which has a removable lid and the presence of the cell culture could be produced by adjusting the desired cell density in the cell culture medium, opening the lid of the cell culture container, pipetting the desired volume of cell suspension into the cell culture container, and closing the cell culture container with the lid.
10. Method according to one or more of Claims 1 to 9, characterized in the fact that RPMI 1640 is used as the cell culture medium.
11. Method according to one or more of Claims 1 to 10, characterized in the fact that at least $1 \cdot 10^5$ cells per ml of cell culture space are provided.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. Method according to one or more of Claims 1 to 11, characterized in that each cell is at an average distance of 0 μm to 600 μm from the closest membrane of the first and second membrane systems.

13. Method according to one or more of Claims 1 to 12, characterized in that a fluid nutrient medium, RPMI 1640 is used.

14. Method according to one or more of Claims 1 to 13, characterized in that the gaseous medium has a pO_2 from 0 to 160 mmHg and a pCO_2 from 0 to 115 mmHg.

15. Method according to one or more of Claims 1 to 14, characterized in that the cell culture medium contains a bicarbonate buffer and the pCO_2 in the gaseous medium added is adjusted so that the pH value of the cell culture medium is between 6.8 and 7.8.

16. Method according to one or more of Claims 1 to 15, characterized in that gaseous metabolic products are removed by means of the second membrane system from the cell culture chamber.

17. Method according to one or more of Claims 1 to 16, characterized in that individual active substances and/or combinations of several active substances are added on a time-staggered basis.

18. Method according to one or several of Claims 1 to 17, characterized in that the active substance dosage is added directly or by means of the first membrane system to the cell culture chamber.

19. Method according to one or more of Claims 1 to 18, characterized in that the active substance concentration-time curve is created by the permeabilities of the first membrane system, by the duration of the active substance administration, and by the active substance concentration.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20. Method according to one or more of Claims 1 to 19, characterized in that the cell culture container is kept at a temperature of 37°C.

21. Method according to one or more of Claims 1 to 18, characterized in that the cell vitality is monitored by means of a cell vitality dye.

22. Method according to Claim 21, characterized in that Alamar Blue[®] serves as a cell vitality dye.

23. Method according to one or more of Claims 1 to 22, characterized in that the cell vitality is monitored using at least one sensor.

24. Method according to Claim 23, characterized in that a fluorescence sensor is used.

25. Device comprising a cell culture container (1) suitable for collecting a cell culture in a cell culture medium with an internal chamber (2), with first means for supplying at least one nutrient medium and second means for adding at least a gaseous medium located in the interior, with the means having a supply side and a removal side, and with a cell culture chamber formed between these means and the inside wall of the inside chamber, and with the first means in a fluid connection with the supply side connected by a nutrient medium dispensing unit (3) with at least one nutrient medium container (4), and the second means connected in a fluid connection with the supply side connected by a gas metering unit (5) with at least one gas supply container (6), characterized in that the cell culture chamber has a volume of 5 ml maximum and 0.1 ml minimum, that the device of the additional means (7), (8), (9a), (9b), and (9c) contains means for supplying at least one active substance to the cell culture chamber and means for supplying an active substance concentration-time curve in the cell culture chamber.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26. Device according to Claim 25, characterized in that the first means are in a fluid connection with their removal side with a waste container (10).

27. Device according to Claim 25, characterized in that the first means are in a fluid connection with the removal side by a recirculation line (11) with the at least one nutrient medium container (4).

28. Device according to one or more of Claims 25 to 27, characterized in that that the first means consists of at least one membrane suitable for supplying liquid nutrient medium.

29. Device according to one or more of Claims 25 to 28, characterized in that the second means consist of at least one membrane suitable for gas exchange.

30. Device according to one or more of Claims 25 to 29, characterized in that the cell culture container (1) has a bottom and a lid which bound the interior chamber, are opposite one another, and consist of a transparent material.

31. Device according to Claim 30, characterized in that a heating system is integrated into the bottom of cell culture container (1).

32. Device according to one or several of Claims 25 to 31, characterized in that the at least one membrane of the first medium is a semipermeable medium or a hydrophilic microporous membrane.

33. Device according to one or more of Claims 25 to 32, characterized in that the at least one membrane of the second medium is an oxygenation membrane.

34. Device according to one or more of Claims 25 to 33, characterized in that the membranes of the first and second medium are hollow fibers.

35. Device according to one or more of Claims 25 to 34, characterized in that the hollow fibers are located in the interior chamber in several layers on top of one another.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

36. Device according to Claim 35, characterized in that the distance of the hollow fibers forming the individual means are stacked between 50 μ m and 600 μ m apart.

37. Method according to one or more of Claims 25 to 36, characterized in that the cell culture chamber has a volume of 0.3 ml to 3.0 ml.

38. Device according to one or more of Claims 25 to 37, characterized in that the means for adding the active substance consist of at least one active substance supply container (7), at least one active substance metering device (8), and a system of lines (9) which connects the at least one active substance supply container (7) through an active substance metering unit (8) directly (9a) or by first medium (9b) with the cell culture chamber of cell culture container (1).

39. Device according to one or more of Claims 25 to 38, characterized in that the device has a means for monitoring cell vitality.

40. Device according to Claim 39, characterized in that the means for monitoring cell vitality consists of at least one sensor.

41. Device according to Claim 40, characterized in that the sensor is a fluorescence sensor.

42. Modular active substance testing system comprising at least two devices according to Claims 25 to 41.

43. Modular active substance testing system according to Claim 42, consisting of 6, 24, or 96 devices according to Claims 25 to 41.

44. Use of the device according to one or more of Claims 25 to 41 or of the modular active substance testing system according to one of Claims 42 or 43 for in-vitro testing of the effect of active substances on cells.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

45. Use of the device or of the modular system according to Claim 44, characterized in that the influence of pharmacokinetics on cell vitality of is determined.

THIS PAGE BLANK (USPTO)